Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)
OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID : 10732

To cite this version :
Lenfant, François. *Mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte de la Besnoitiose bovine à Besnoitia besnoiti.* Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2013, 125 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ANNEE 2013 THESE : 2013 – TOU 3 – 4060

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE DE LA BESNOITIOSE BOVINE A *BESNOITIA BESNOITI*

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse

par

LENFANT François
Né, le 21 avril 1987 à POITIERS (86)

Directeur de thèse : M. Emmanuel LIENARD

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESSEURS :
M. Emmanuel LIENARD Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
M. Michel FRANC Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITÉ :
M. Jean-Pierre ALZIEU Docteur vétérinaire au Laboratoire Vétérinaire Départementale de l'Ariège

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Fôret
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. **A. MILON**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M **DELVERDIER Maxence,** *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François,** *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechnie*
M. **DUCOS DE LAHITTE** Jacques, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **MAILLARD Renaud,** *Pathologie des Ruminants*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent,** *Pathologie de la reproduction*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle,** *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

M. **BOURRET Vincent,** *Microbiologie et infectiologie*
Mme **FERNANDEZ Laura,** *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

Remerciements

Aux membres du jury de thèse

A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN
Professeur des Universités
Praticien Hospitalier
Zoologie et Parasitologie
Qui nous fait l'honneur d'accepter de présider notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Monsieur le Docteur Emmanuel LIENARD
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et Maladies parasitaires
Qui nous a fait l'honneur d'accepter la direction de notre thèse,
Pour sa disponibilité, son écoute, ses conseils,
Qu'il reçoive ma profonde reconnaissance,
Et mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Michel FRANC
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et Maladies parasitaires
Qui nous a fait l'honneur de prendre part à notre jury et son soutien à cette étude,
Sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur Jean-Pierre ALZIEU
Docteur vétérinaire au Laboratoire Vétérinaire Départementale de l'Ariège
Qui nous fait l'honneur d'accepter d'assister à cette thèse,
Pour sa contribution à ce travail,
Hommages respectueux.

Aux personnes ayant aidé à l'aboutissement de cette thèse

A Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Parasitologie et Maladies parasitaires
Qui m'a confié ce sujet,
Pour son écoute, ses conseils,
Qu'il reçoive mes sincères remerciements.

Au Service de Parasitologie

Et plus particulièrement Christelle GRISET et Françoise PREVOT,
Pour leur aide précieuse durant ce travail de thèse.

« Je crois que vous vous trompez si vous pensez que le bonheur dans la vie réside principalement dans les relations humaines. Le bonheur se trouve tout autour de nous, il est partout, il est dans tout ce que nous pouvons expérimenter. Et pour le savoir il faut changer le regard que nous portons sur les choses. »

Chris McCandless

A ma famille

A mes parents, pour votre soutien durant ces longues années studieuses, malgré la distance qui nous sépare. Vous m'avez donné tous les moyens pour arriver au bout, je vous dois cette réussite. Merci infiniment...

A ma sœur, pour ta bonne humeur et ton optimisme inconditionnels. Tu as su réussir ta vie, je suis très fier d'avoir une sœur comme toi.

A ma mamie Simonne, parce que tu as toujours cru en ma réussite, je sais que tu as beaucoup prié pour moi, merci du fond du cœur. Je suis tellement fier d'avoir une super mamie comme toi.

A ma mamie Jeannette et mon papy Jacques, pour votre gentillesse, pour tous les bons moments passés en votre compagnie, chez vous, chez Jean-Pierre, aux Etats-Unis, et pour tout l'amour que vous témoignez envers vos petits-enfants.

A mes amis…

… de longues dates

A Antoine, Nicolas et Quentin, les compères, les mousquetaires, pour notre amitié sans faille depuis plus de 20 ans, pour tous ces beaux moments qu'ils nous restent à vivre ensemble.

… de lycée

A Ryadh, pour ton amitié vieux frère, pour nos sketchs, ta grande gueule, nos vacances à Saint-Georges-de-Didonne, nos moments de « galériens ».

A Arnaud, pour ton humour, nos fous rires en cours, nos sketchs, nos soirées un peu trop arrosées à Limoges (qui parle de Ti punch ?).

A Coraline, pour ta bonne humeur caractéristique, ta fraise, ta générosité, et pour nos futures aventures australiennes à Sydney.

A Maxime, Kévin, Martial, pour tous les bons moments passés ensemble au lycée et depuis, et tous ceux à venir, en commençant par l'hiver prochain !

… de prépa

A Frankie, pour tous les bons moments qu'on a pu tirer des années prépa.

A Kama et Emilie, pour m'avoir fait passer une année de cube des plus mémorables, entre les soirées films dans le $5m^2$ de Kama, les fous-rires en cours avec cette vieille Zobinette, et les « réseaux wow » organisés à la « one again and bis to fly » en attendant les résultats.

A Vincent et Robert, pour toutes ces soirées passées perchés dans les arbres, ou à déambuler dans la clairière des agros.

A Anaïs, Julie et Sophie.

…de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

A Philippe, pour cette vie de buiatres qui nous attend, pour toutes ces préchauffes bâtiment A, ces « têtes phalliques » et autres expressions directement descendues de Corrèze par ce bon vieux ***Thomas***.

A Tibor, pour notre amitié qui a su évoluer depuis l'école maternelle, pour les bou'hons, les « tsao » balancés à tout-va, tes chopes de booms, tes « faut trois conditions pour un râteau », ta première cuite au voyage géol'.

A Laf', pour cet inoubliable voyage au bout du monde où nous avons su chasser le kiwi sauvage, où nous nous sommes baignés dans les sources d'eau chaude, où nous avons su nous remonter le moral grâce à de grandes pintes de Kilkenny, de Guinness et de bières « homemade », où nous avons vadrouillé à travers les plus beaux paysages de la Terre du Milieu grâce à notre voiture de compet'.

A Tiffany, pour ta générosité, ta bonne humeur, tes cochons, ta tête de tifanu's, nos boomettes de poulots, notre recueil d'expressions : « mais pas plu hein ? », « poulus désaffectus », non et toi ? », « regarde le lui là-bas », « qui parle de ? », « vignoble », « bordel de cul de merde », « tsao », « enfoiré », « gueux », « fait pas 'haud hé », « tu le sais hein », « dépité », ah ça... », etc.

A Nicolas, pour notre périple en Normandie au pays des chevaux à 1 million, pour tes M&M's, tes « c'est pas un PC, c'est un mac », tes « Bonjour, un filet-o-fish et une boite de nuggets svp », tes « Fausty, il l'aime le produit », tes merveilleuses imitations.

A Matatias, pour notre goût commun à la musique, au tennis, et au dessin… nan je rigole, et à la bière bien sûr ! Toi seul maitrise la plume.

A Alex, pour ton accent et tes expressions inimitables « tu m'as cassé de rire », pour ton envie de profiter de la vie à fond, pour nos vacances à Arcachon, notre virée à Barcelone chez les pakistanais « cerveza beer my friends ».

A Valentine, pour ta personnalité hors du commun, nos moments de galère et de joie durant notre année (mois) de bovine, pour ta générosité, pour Attila qui sait embrigader Féroé pour tout et n'importe quoi (qui parle de manger du raticide ?).

A Olivier, pour tes « olaolaoO » sortis de nulle part, pour nos parties de tennis, nos nombreuses corrections ronéo, nos soirées ciné club improvisées salle Diop.

A Arthur, pour nos virées à Bisca', pour l'organisation et les soirées montages de la Revue, pour les bou'hons près des boites aux lettres ou au Connexion.

A Aurélien, pour ta bonne humeur, nos parties de tennis, tes « ce soir, c'est caniveau pour tout le monde ».
A Isabelle et Amélie, pour nos projections privées au ciné club, pour nos soirées karaoké (ou pas…).

A Maxime, pour ta force tranquille, nos fous rires, nos jeux de booms.

A Solène, pour nos soirées « un dîner presque parfait », nos boomettes de poulots, les quelques soirées à Mont de Marsan l'été et pour le réveillon.

A Katy, pour nos sorties derrière le terrain de tennis avec les 'ienchs, nos soirées chez mémé, pour le monument, pour ta gentillesse.

A Marlène, pour ta bonne humeur, ta générosité lorsque tu as su héberger un vieil ermite deux semaines chez toi.

A Anne-lise, Léa, Joséphine, Laure, et Marion.

A mes poulots, plus particulièrement ***Marie, Léa, Ezhvin, Julia***, sans qui je n'aurai jamais perdu toutes mes affaires sur la plage à la Faute-sur-mer et sans qui on n'aurait pas passé de si « parfaites » soirées ; mais aussi ***Maxime, Fabien, Guillaume, Fanny, Guilhem, Adèle, Renaud, Marie-Lou,*** pour votre simplicitité et les bons moments passés en votre compagnie.

A ceux que j'oublie

Et pour finir,

A Auréline, pour ces cinq années à tes côtés déjà, pour tout, tous les jours, pour être là, pour être toi...

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ANNEXES 18

LISTE DES FIGURES 19

LISTE DES TABLEAUX 20

LISTE DES PHOTOS 21

LISTE DES ABREVIATIONS 24

INTRODUCTION 25

CHAPITRE 1 : LA BESNOITIOSE BOVINE, ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 27

I. PRESENTATION GENERALE 29

A. Définition 29

B. Synonymie 29

C. Historique 30

D. Importance 31

II. ETIOLOGIE 32

A. Systématique 32

B. Morphologie des différents stades parasitaires 35

1. Les ookystes 35
2. Les tachyzoïtes 35
3. Les kystes à bradyzoïtes 36
4. Les bradyzoïtes 38

C. Cycle évolutif 39

1. Actualités autour du cycle évolutif de Besnoitia besnoiti 39
2. Les oiseaux migrateurs comme hôtes intermédiaires et définitifs ? 40
3. Evolution du parasite 41

a. Cycle épidémiologique de Besnoitia besnoiti : schématisation 41

b. Cycle *hétéroxène de chat à bovin, d'importance mineure* 41

c. Cycle homoxène de bovin à bovin, d'importance capitale 43

III. EPIDEMIOLOGIE 44

A. Epidémiologie descriptive 44

1. Répartition géographique 44

a. Distribution à l'échelle mondiale 44

b. Distribution à l'échelle nationale 45

2. Facteurs de sensibilité et de réceptivité 46

a. L'âge 46

b. Le sexe 46

c. La race 47
d. Le mode d'élevage 47
e. La saison 47
3. Prévalence et incidence 48
B. Epidémiologie analytique 49
1. Transmission par voie transcutanée 49
a. Via les arthropodes piqueurs 49
b. Via le matériel d'injection 53
2. Autres modes de transmission non clarifiés 54
a. Contamination par voie orale et par contact direct 54
b. Transmission par voie indirecte 54
c. Transmission par voie verticale 54
IV. ETUDE CLINIQUE 55
A. Pathogénie 55
B. Immunité 55
C. Symptomatologie 56
1. Phase aiguë et fébrile 56
2. Phase des œdèmes 57
3. Phase de sclérodermie 59
D. Lésions macroscopiques 64
E. Lésions microscopiques 68
1. Phase fébrile et d'œdèmes 68
2. Phase de sclérodermie 68
V. DIAGNOSTIC 70
A. Epidémio-clinique 70
B. Différentiel 70
1. Pendant la phase fébrile 70
2. Pendant la phase des œdèmes 70
3. Pendant la phase de sclérodermie et de dépilations 71
C. Expérimental 72
1. Méthodes dites « directes » : mise en évidence du parasite 72
a. Histologie 72
b. Polymerase Chain Reaction (PCR) 73
c. Immunofluorescence directe 74
2. Méthodes dites « indirectes » : sérologie 74
a. Immunofluorescence indirecte (IFI) 74
b. Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay (ELISA) 75
c. Western Blot (WB) 77
d. Réaction d'agglutination 79
VI. MOYENS DE LUTTE 80
A. Outils thérapeutiques 80
1. Historique 80
2. Les sulfamides, mêmes molécules mais une posologie qui évolue ! 80
3. Autres solutions 81

B. Mesures de prévention 81
1. Prophylaxie médicale 81
2. Prophylaxie sanitaire 82
a. Les principes de base 82
b. Le contrôle dans les cheptels infectés 83
c. Le contrôle et la protection en cheptels indemnes 83

CHAPITRE 2 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE DE LA BESNOITIOSE BOVINE A BESNOITIA BESNOITI 85

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE 87
II. MATERIELS ET METHODES 88
A. Banque de sérums bovins 88
1. Sérums « standards » (n = 232) 88
2. Sérums « douteux » (n = 110) 88
3. Sérums de bovins séropositifs à *Neospora caninum* ou *Toxoplasma gondii* par ELISA (n = 57) 88
4. Autres sérums (n = 4) 89
B. Production de *Besnoitia besnoiti* 89
C. Fixation sur lame de l'antigène 89
D. Tests des sérums par Immunofluorescence Indirecte 90
E. Détermination de la dilution optimale de la solution de tachyzoïtes 93
F. Analyse des données 93
III. RESULTATS 95
A. Photographies au microscope à ultra-violets 95
1. Témoin positif 95
2. Témoin négatif 96
3. Sérums problématiques 96
B. Optimisation de l'IFI 97
C. Comparaison des résultats ELISA et WB 97
D. Performances de l'IFI 99
IV. DISCUSSION 101
A. Matériels et méthodes 101
B. Résultats 101
C. Conclusion partielle 103

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 105

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 107

ANNEXES 115

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Protocole : du kyste à bradyzoïtes aux tachyzoïtes 116

Annexe 2 : Protocole : culture des cellules Vero et mise en culture des tachyzoïtes de *B. besnoiti* 118

Annexe 3 : Mode d'emploi : PrioCHECK® Besnoitia Ab 120

Annexe 4 : Mode d'emploi : PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 123

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Place de *Besnoitia besnoiti* dans la classification 32

Figure 2 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ADNr de la petite sous-unité ribosomale 33

Figure 3 : Arbre phylogénétique construit à partir de la région ITS-1 des différentes espèces du genre *Besnoitia*. 34

Figure 4 : Représentation schématique d'ookystes de coccidies retrouvées dans les fèces d'un chat 35

Figure 5 : Représentation schématique d'un kyste à bradyzoïtes 37

Figure 6 : Les deux cycles possibles dans la besnoitiose bovine 41

Figure 7 : Cycle hétéroxène Chat – Bovin 42

Figure 8 : Cycle homoxène Bovin – Bovin 43

Figure 9 : Répartition mondiale des différentes espèces de *Besnoitia*. Agrandissement : Expansion chronologique de *B. besnoiti* en Europe 44

Figure 10 : Répartition géographique des cas cliniques de besnoitiose bovine 45

Figure 11 : Répartition des cas de besnoitiose en fonction de l'âge des bovins 46

Figure 12 : Saisonnalité étendue des cas cliniques en région Provence-Alpes Côte d'Azur de 2005 à 2008 48

Figure 13 : Sensibilité de la PCR en temps réel d'ITS1 ADNr 73

Figure 14 : Comparaison entre le Western Blot d'animaux infectés par *Besnoitia besnoiti* et d'animaux non infectés 78

Figure 15 : Immunoblot de bovins infectés expérimentalement par différentes espèces de *Sarcocystis*, par *Toxoplasma gondii*, par *Neospora caninum* et par *Besnoitia besnoiti*, utilisant des antigènes non-réduit de tachyzoïtes (A) et de bradyzoïtes (B) de *Besnoitia besnoiti* 79

Figure 16 : Proposition de conduite à tenir au cas de dépistage positif de besnoitiose dans un élevage auparavant indemne 82

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Synonymie chronologique de la besnoitiose bovine 29

Tableau 2 : Classification des symptômes au stade fébrile de la maladie en fonction de l'appareil atteint 56

Tableau 3 : Ensemble des lésions macroscopiques observables lors des différentes phases de la besnoitiose 64

Tableau 4: Ensemble des lésions microscopiques observables lors de la phase de sclérodermie de la besnoitiose 68

Tableau 5 : Comparaison des résultats de l'ELISA et du WB pour les 342 sérums présentant un résultat ELISA (groupes « standards » et «douteux ») 98

Tableau 6 : Sensibilité, spécificité et accord de l'ELISA par rapport au WB (Gold standard), en considérant les 342 sérums présentant un résultat ELISA (groupes « standards » et «douteux ») 99

Tableau 7 : Résultats de l'IFI à la dilution 1:200 des différents groupes de sérums étudiés .. 99

Tableau 8 : Résultats du WB et de l'IFI pour la totalité des sérums 100

Tableau 9 : Sensibilité, spécificité et accord de l'IFI par rapport au WB, en considérant la totalité des sérums testés 100

Tableau 10 : Comparaison des performances de l'IFI (1:200) et de l'ELISA (DO 20)..... 103

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : (a) Tachyzoïtes dans une cellule Vero infectée ; (b) Tachyzoïtes libres dans le sang 35

Photo 2 : Tachyzoïtes dans une cellule Vero infectée, observés au microscope électronique à transmission..... 36

Photo 3 : Coupes histologiques de peau montrant de très nombreux kystes de *Besnoitia besnoiti* dans le derme 37

Photo 4 : Bradyzoïtes par observation au microscope électronique à transmission..... 38

Photo 5 : *Tabanus* sp. (Taon)..... 50

Photo 6 : *Stomoxys calcitrans* (Mouche d'étable)..... 50

Photo 7 : *Haematobia irritans* (Mouche des cornes) 51

Photo 8 : *Glossina* sp. (Mouche tsé-tsé)..... 51

Photo 9 : *Aedes* sp. (Moustique)..... 51

Photo 10 : *Culicoïdes* sp. (Moucheron piqueur)..... 51

Photo 11 : *Simulium* sp. (Mouche noire)..... 52

Photo 12 : *Hippobosca* sp. (Mouche plate) 52

Photo 13 : *Musca domestica* (Mouche domestique)..... 52

Photo 14 : Phase fébrile : épiphora, photophobie et jetage séreux..... 57

Photo 15 : Phase fébrile : jetage séreux filant 57

Photo 16 : Phase des œdèmes : œdèmes déclives sur les membres (plis d'œdèmes, gonflement des boulets) 58

Photo 17 : Phase des œdèmes : plissements et hyperkératose au niveau des bourses testiculaires..... 58

Photo 18 : Phase d'œdèmes : zones violacées à la base des trayons..... 58

Photo 19 : Fin de la phase des œdèmes : complications de crevasses avec exsudats séro-hémorragiques à l'extrémité des membres..... 59

Photo 20 : Phase de sclérodermie : hyperkératose et plis cutanés à la phase interne des cuisses

..... 60

Photo 21 : Phase de sclérodermie : plis d'hyperkératose sur les membres et dépilations diffuses 60

Photo 22 : Phase de sclérodermie : déformation intense des trayons et hyperkératose tégumentaire 60

Photo 23 : Phase terminale : émaciation, hyperkératose, déformations articulaires, mélanose des muqueuses et de leur pourtour 61

Photo 24 : Phase terminale : hyperkératose, déformations articulaires 61

Photo 25 : Phase terminale : hyperkératose, dépilation, éléphantiasis 62

Photo 26 : Phase terminale : hyperkératose et mélanose du pourtour du mufle 62

Photo 27 : Phase de sclérodermie : kystes sur le limbe scléro-cornéen et la conjonctive. Hyperkératose cutanée périoculaire avec formation de plis et dépilations 62

Photo 28 : Phase de sclérodermie : kystes sur le limbe scléro-cornéen et la conjontive palpébrale 63

Photo 29 : Phase fébrile : aspect congestivo-hémorragique de la carcasse 65

Photo 30 : Phase de sclérodermie : nombreux kystes à bradyzoïtes dans le tissu conjonctif sous-cutané 66

Photo 31 : Phase de sclérodermie : kystes à bradyzoïtes dans la muqueuse trachéale d'une vache infectée chroniquement 66

Photo 32 : Phase de sclérodermie : kystes à bradyzoïtes de la taille d'une tête d'épingle sur la sclérotique 67

Photo 33 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » à la dilution 1:200, au grossissement x1600 90

Photo 34 : Préparation des dilutions au 1 :100, 1 :200, 1 :400, 1 :800 des différents sérums à tester, ainsi que des témoins positifs et négatifs 90

Photo 35 : Dépôt des préparations dans les puits pour les sérums n°91 et n°105 91

Photo 36 : Incubation en chambre humide 45 min à 37°C 91

Photo 37 : Rinçage des lames dans de l'eau distillée 91

Photo 38 : Préparation de Bleu Evans à 0,05% 92

Photo 39 : Dépôt des préparations (Conjugué / Bleu Evans) dans les puits..... 92

Photo 40 : Dépôt de Fluoprep® dans chaque puits, puis mise en place d'une lamelle par lame 93

Photo 41 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:100..... 95

Photo 42 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:200..... 95

Photo 43 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:400..... 95

Photo 44 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:800..... 95

Photo 45 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin négatif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:100..... 96

Photo 46 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:200..... 96

Photo 47 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:400..... 96

Photo 48 : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 à la dilution 1:800..... 96

Photo 49 : Observation de tachyzoïtes sur une lame de sérum « douteux » au microscope à UV à la dilution 1:200 ; (a) x400 (b) x1600..... 97

Photo 50 : Observation de tachyzoïtes sur une lame de sérum « douteux » au microscope à UV à la dilution 1:400 ; (a) x400 (b) x1600..... 97

LISTE DES ABREVIATIONS

AANE : Acides aminés non essentiels

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal

AMM : Autorisation de mise sur le marché

DO : Densité optique

EFSA : European food safety authority

ELISA : Enzyme linked immunosorbant assay

ENV : Ecole Nationale Vétérinaire

IC : Intervalle de confiance

IFI : Immunofluorescence indirecte

IgG : Immunoglobuline G

ITS-1 : Internal transcribed spacer 1

kDa : kilodalton

MEM : Minimum essential medium

PCR : Polymerase chain reaction

PV : Poids vif

RT-PCR : Real-time polymerase chain reaction

Sp. : Espèce (*species*)

Spp. : Espèces (*species pluralis*)

TTC : Toutes taxes comprises

VPN : Valeur prédictive positive

VPP : Valeur prédictive négative

WB : Western Blot

κ : coefficient kappa de cohen

INTRODUCTION

La Besnoitiose bovine, due au protozoaire *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912), est une maladie vectorielle répandu en Afrique, en Asie et dans le sud-ouest de l'Europe (Jacquiet et al., 2010). Depuis 2010, la besnoitiose a été déclarée comme très fortement émergente en Europe par l'European Food Safety Authority (EFSA). Elle est responsable de récentes épizooties en Suisse (Lesser et al., 2012), en Italie (Gollnick et al., 2010 ; Mutinelli et al., 2010) et en Allemagne (Mehlhorn et al., 2009). C'est en France qu'elle fut pour la première fois décrite, à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, au début du 20^{e} siècle par Besnoit et Robin (1912).

La maladie se compose de trois phases : fébrile, œdèmes, sclérodermie. De lourdes pertes économiques sont observées dans les élevages atteints, dues à une stérilité transitoire ou définitive chez les taureaux, à des avortements, à des diminutions de la production laitière, à des mortalités, et à des diminutions de la condition corporelle, entrainant des non-valeurs économiques (Pols, 1960 ; Cortes et al., 2005). Toutefois, les animaux malades ne constituent qu'une petite partie des animaux infectés (Alzieu et al., 2011). En effet, plusieurs enquêtes épidémiologiques européennes ont révélé la proportion plus importante d'animaux infectés asymptomatiques, séropositifs et porteurs de la maladie (Alzieu et al., 2012). La besnoitiose circule en Europe à la suite d'échanges commerciaux, comme en témoigne les épizooties récentes dans le massif Central, les Alpes françaises, et occasionnellement dans la région de la Loire (Alzieu et al., 2007a).

Un siècle après sa première description, la maladie reste toujours mystérieuse sur de nombreux points. En particulier, le cycle évolutif de *B. besnoiti* et les voies de contamination qui ne sont pas franchement clarifiés (Diesing et al., 1988 ; Schares, 2011; Olias et al., 2011). La transmission horizontale entre bovins via des contaminations transcutanées par les insectes hématophages, est probablement la plus répandue. Il a été démontré que *Stomoxys calcitrans* et les espèces de Tabanidés peuvent agir comme des vecteurs mécaniques de *B. besnoiti* (Bigalke, 1968). Ainsi, un pic saisonnier de populations d'insectes hématophages influence grandement le nombre de bovins nouvellement infectés dans les élevages (Liénard et al., 2011). L'avenir d'un cheptel dépend souvent de la précocité du diagnostic. Il existe de nombreuses méthodes sérologiques pour confirmer les suspicions cliniques ou pour détecter les animaux infectés (y compris les asymptomatiques). Celles-ci ont été améliorées, il s'agit de l'Immunofluorescence indirecte, de l'ELISA, du Western Blot et de la PCR (Goldman et Pipano, 1983 ; Shkap et al., 1984 ; Cortes et al., 2006a,b, 2007 ; Fernández-García et al., 2009b ; Schares et al., 2010).

A la différence du Portugal, de l'Espagne et de l'Allemagne, en France l'immunofluorescence indirecte n'est pas encore utilisée en routine pour le diagnostic de la besnoitiose à *B. besnoiti*. L'objet de cette étude a été la mise au point de cette technique, afin qu'elle puisse être utilisée quotidiennement au service de parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Le premier chapitre est une étude bibliographique dans lequel est réalisé un bilan sur les connaissances actuelles sur la besnoitiose, en insistant notamment sur les techniques diagnostiques. Le second chapitre présente les résultats de nos travaux effectués pendant trois mois au service de parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

CHAPITRE 1 :

LA BESNOITIOSE BOVINE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PRESENTATION GENERALE

A. Définition

La besnoitiose bovine est une maladie parasitaire, due à un protozoaire, *Besnoitia besnoiti*, appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa* et à la famille des *Sarcocystidae* (Jacquiet et al., 2010 ; Euzeby, 1987). Elle touche essentiellement les jeunes bovins de deux à quatre ans (Alzieu et al., 2007a). D'un point de vue clinique, on distingue trois phases : une première qui se traduit par une poussée de fièvre que l'on nommera la phase fébrile, une seconde définie par l'apparition d'œdèmes, et une dernière caractérisée par une dermatose dévoilant des dépilations et des sclérodermies (Franc, 1987). La morbidité est souvent importante, proche des 90% en zone d'enzootie (Ferrié, 1984). Par contre, la mortalité est plutôt faible, avoisinant les 10% (EFSA, 2010). Il s'agit d'une maladie difficile à diagnostiquer durant la phase initiale puisqu'à ce moment là, la besnoitiose correspond à un syndrome fébrile intense, difficilement différentiable d'autres maladies.

B. Synonymie

Depuis 1817, les termes employés pour désigner cette maladie ont changé de nombreuses fois, pour aboutir à la besnoitiose bovine, adoptée depuis 1980. Tous les synonymes utilisés font référence aux aspects cliniques et lésionnels de la maladie (tableau 1)

Synonymes	**Pays**	**Référence**
Éléphantiasis du bœuf	Français	Santin, 1817
Rouge des Bovidés	Français	Taiche, 1831
Fièvre angioténique	Français	Gellé, 1840
Lèpre	Français	Gellé, 1840
Lèpre éléphantiasique	Français	Gellé, 1840
Enbouffounadis	Français occitan	Causse, 1857
Maladie rouge	Français	Festal, 1859
Anasarque des bovins	Français	Cadeac, 1884
Sarcosporidiose cutanée bovine	Français	Besnoit & Robin, 1912
Chimurra (rides)	Français basque	Bourde, 1928
Globidiose cutanée du bœuf	Français	Cuillé, 1937
Lipoa	Français basque	Berthelon et al., 1938
Lortista	Français basque	Berthelon et al., 1938
Sarcosporidiosis cutanea de los bovinos	Espagnol	Vogelsand et al., 1941
Dermatosis verrugosa por *Besnoitia globidium*	Espagnol	Vogelsand et al., 1941
Globidiosis of cattle	Anglais	Hofmeyr, 1945
Anasarca bovina	Portugais	Leitao, 1949
Besnoitiose bovino por *Globidium besnoiti*	Portugais	Leitao, 1949
Dermite verrugosa parasitaria	Portugais	Leitao, 1949
Sarcospordiose bovina	Portugais	Leitao, 1949
Globidiose bovino por *Globidium besnoiti*	Portugais	Leitao, 1949

Akanyaga	Rwandais	Herin, 1952
Globidiose cutanée	Français	Herin, 1952
Runderglobidiosis	Néerlandais	Herin, 1952
Bovine cutaneous globidiosis	Anglais	Pols, 1954
Elephant skin disease	Anglais	Schulz, 1960
Bovins besnoitiosis	Anglais	Pols, 1960
Bovine cutaneous sarcosporidiosis	Anglais	Pols, 1960
Besnoitiose bovine	**Français**	**Euzeby, 1980**

Tableau 1 : Synonymie chronologique de la besnoitiose bovine d'après Jeuland (2010)

C. Historique (Ferrié J, 1984 ; Franc M, 1987 ; Legrand P, 2003 ; Jacquiet et al., 2010 ; Álvarez-García et al., 2013)

Depuis l'Antiquité, la besnoitiose bovine intrigue et fascine. Les premières descriptions datent de la fin du IVe siècle, lorsque VEGECE énonce les symptômes de la phase terminale de la maladie qu'il dénomme alors éléphantiasis.

En 1817, SANTIN, vétérinaire dans le Tarn, décrit d'une manière très imagée les phases d'œdèmes et de sclérodermie : « en ces endroits où il existe des engorgements, le dessèchement de la peau prend l'apparence d'un cuir tanné, elle tombe en lambeaux et s'exfolie comme l'écorce d'un platane ».

En 1840, GELLE, après avoir étudié quelques cas chroniques sévères de la maladie, la définit comme une lèpre, une lèpre éléphantiasique ou bien encore d'éléphantiasis tuberculeux.

En 1843, LAFORE fait la distinction entre une phase aiguë et une phase chronique de la maladie.

En 1858, LAFOSSE distingue 3 phases : début, état, et déclin.

En 1869, CRUZEL nous expose les premiers éléments épidémiologiques : « l'éléphantiasis pourrait être une de ces affections que l'on attribue à la présence d'insectes ou de zoophytes microscopiques ».

En 1912, BESNOIT et ROBIN, professeurs à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, isolent le parasite à partir de lésions cutanées, et prouvent ainsi l'étiologie parasitaire de la besnoitiose.

En 1936, CUILLE arrive à transmettre la maladie à des bovins sains à partir d'injection intraveineuse de sang de bovins contaminés en phase fébrile.

En 1954, POLS réalise une étude approfondie sur la maladie, et permet l'isolement du protozoaire dans le sang de bovins contaminés en phase fébrile.

En 1968, BIGALKE expose l'aspect contagieux de la maladie entre bovins, et démontre l'importance de vecteurs mécaniques dans la transmission.

En 1974, PETESHEV propose un cycle épidémiologique avec pour hôte définitif le chat, le bovin étant l'hôte intermédiaire. Cependant, ses résultats n'ont pas été démontrés par des études ultérieures. L'hôte définitif demeure encore inconnu. Le mode de transmission majoritaire de bovin à bovin se réaliserait par la piqûre d'insectes hématophages.

Aujourd'hui, cela fait un siècle que l'étiologie parasitaire a été démontrée. De nombreux pays européens (Allemagne, Portugal, Espagne, France, Suisse, etc.) continuent les recherches sur la maladie axées essentiellement sur les techniques diagnostiques permettant de déceler la maladie le plus tôt possible.

D. Importance

La besnoitiose bovine a suscité peu d'intérêt jusqu'à la fin du 20^{ième} siècle. En France, la maladie était jusque là seulement rencontrée dans le Sud-Ouest. Des cas cliniques sont maintenant régulièrement rapportés dans les Alpes françaises, le Massif Central et occasionnellement dans la région de la Loire (Alzieu et al., 2007a). Aujourd'hui, on la considère comme une maladie vectorielle émergente en France et en Europe, et en forte extension géographique (EFSA, 2010). C'est une maladie très préoccupante d'un point de vue médical et zootechnique qui risque d'affecter les échanges nationaux et internationaux. La besnoitiose bovine s'achète et doit donc être systématiquement dépistée lors de nouvelles transactions (Alzieu et al., 2011).

II. ETIOLOGIE

A. Systématique

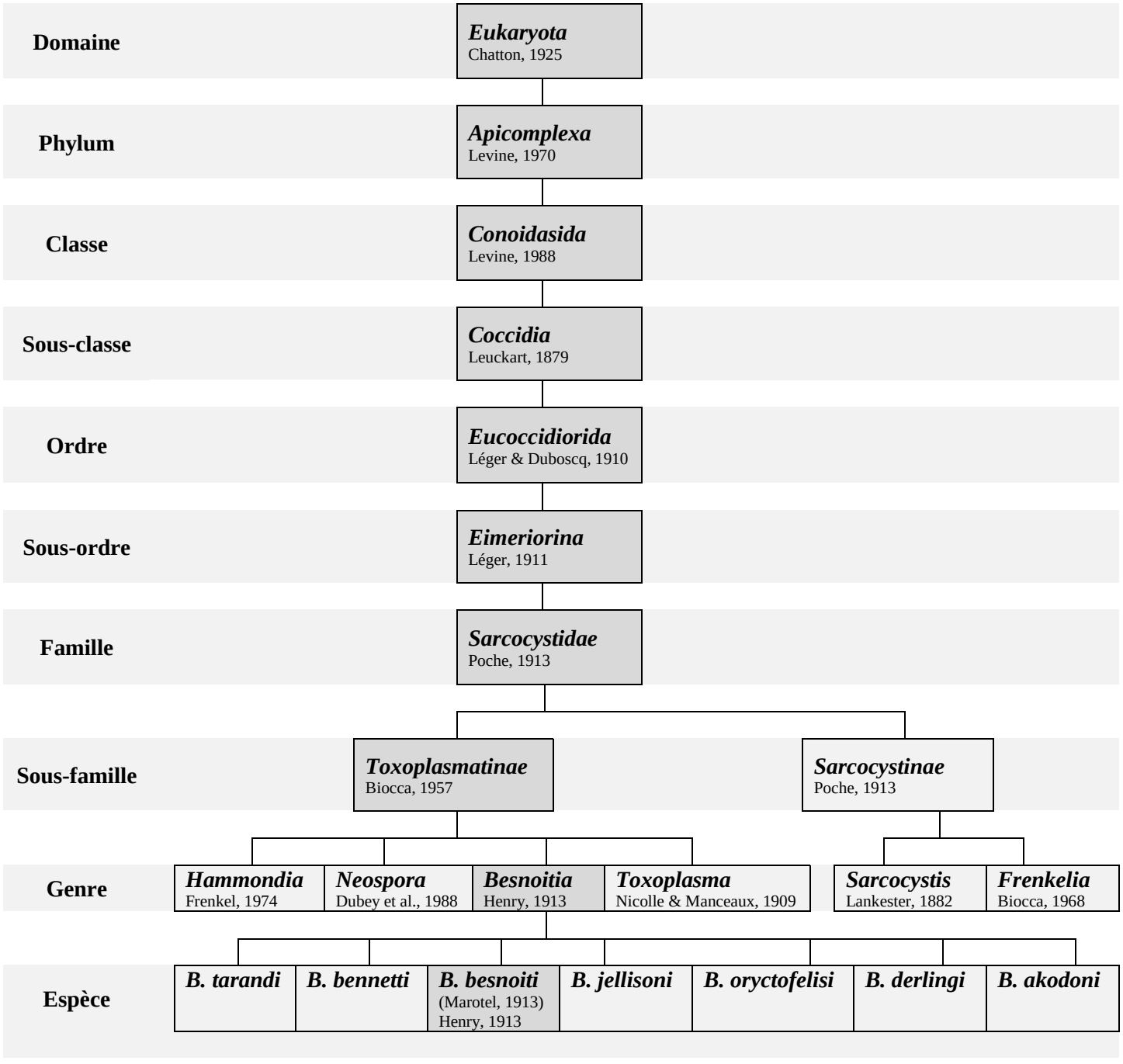


Figure 1 : Place de *Besnoitia besnoiti* dans la classification (Euzeby, 1987 ; Dubey et al., 2004)

Besnoitia besnoiti est un protozoaire parasite obligatoire appartenant à l'embranchement des *Apicomplexa* et à la famille des *Sarcocystidae*. De cette famille résulte deux sous-famille : les *Sarcocystinae* d'une part, où l'on retrouve les genres *Sarcocystis* et *Frenkelia* ; les *Toxoplasmatinae* d'autre part, où l'on retrouve les genres *Hammondia, Neospora, Toxoplasma*, et *Besnoitia* (Frenkel, 1977 ; Tenter et Johnson, 1997) (figure 1).

Les études sur la phylogénie moléculaire, à partir de l'analyse génétique de séquences d'ARNr, ont permis de montrer que *Besnoitia, Hammondia*, quelques *Isospora, Neospora* et *Toxoplasma* formaient un groupe monophylétique (figure 2), et que les espèces de *Besnoitia* formaient un taxon voisin avec d'autres parasites protozoaires d'importance vétérinaire tels que *Toxoplasma gondii* et *Neospora caninum* (Dubey et al, 2007 ; Ellis et al., 2000).

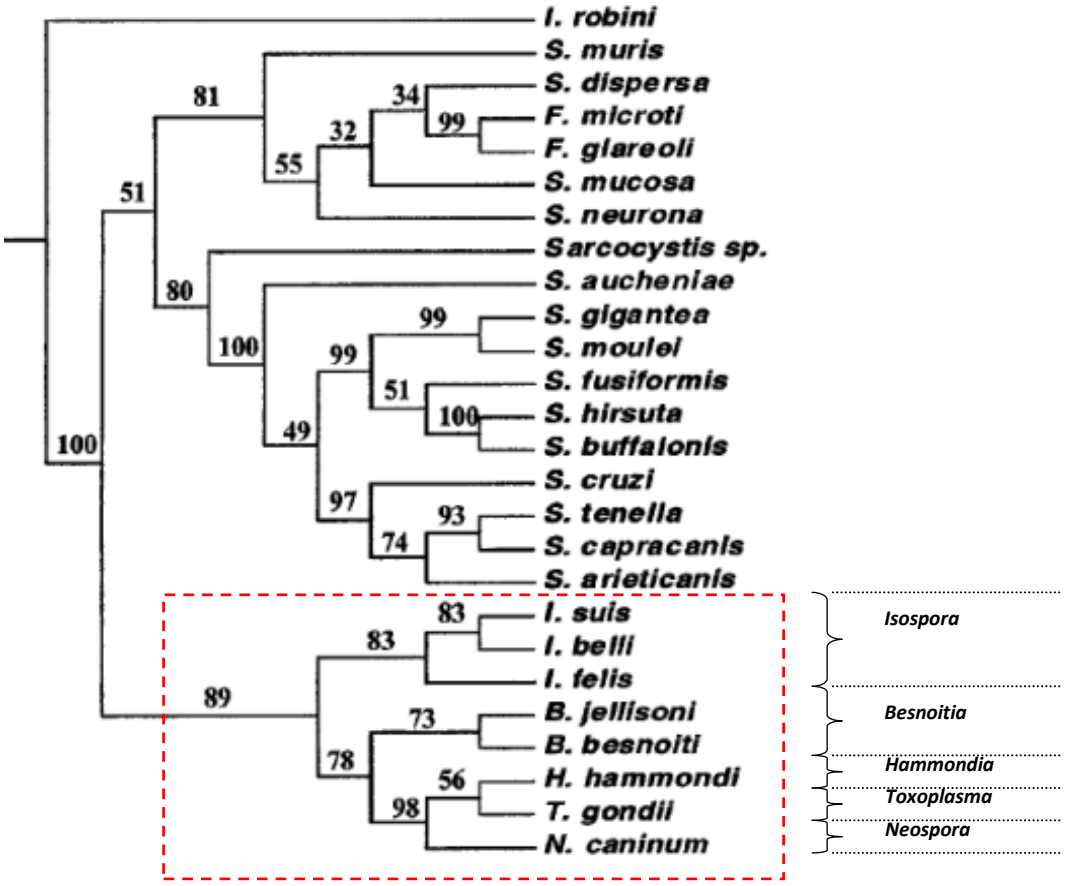


Figure 2 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences de l'ADNr de la petite sous-unité ribosomale (Ellis et al., 2000).

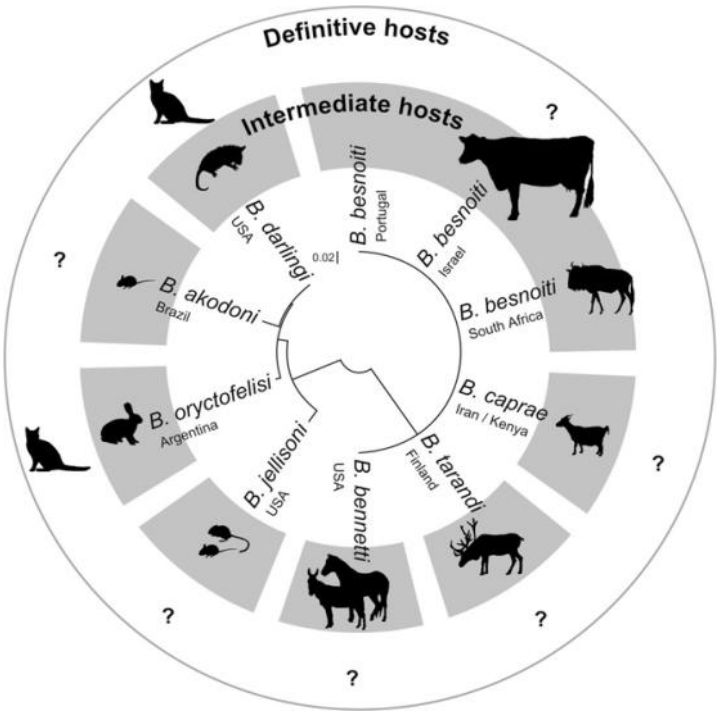


Figure 3 : Arbre phylogénétique construit à partir de la région ITS-1 des différentes espèces du genre *Besnoitia*. Huit *Besnoitia* sur dix sont présentés avec leurs hôtes naturels connus. La barre d'échelle indique la distance génétique (Olias et al., 2011)

En plus de *B. besnoiti*, neuf autres espèces de *Besnoitia* ont été signalées chez les grands mammifères domestiques et sauvages (chèvres, ânes, chevaux, rennes et caribous) ainsi que chez les lagomorphes, les marsupiaux et les lézards. On retrouve donc quatre espèces infectant des grands mammifères (*B. besnoiti, B. caprae, B. tarandi* et *B. bennetti*) et six infectant les petits mammifères (*B. darlingi, B. jellisoni, B. wallacei, B. oryctofelisi, B. akodoni* et *B. neotomofelis*). Les relations évolutives entre ces espèces ont été peu étudiées.

Les régions étudiées de l'ARNr (ITS-1) sont disponibles à partir d'une banque de gènes pour huit espèces de *Besnoitia*. Cette courte séquence génétique (environ 250-270 paires de bases) permet de distinguer clairement les espèces de *Besnoitia* des petits mammifères de celles des grands mammifères (figure 3).

Les régions génomiques de l'ARN ribosomique de plusieurs nouveaux isolements de *B. besnoiti* provenant du Portugal, d'Espagne, d'Israël et d'Allemagne ont été séquencées (Cortes et al, 2006b; Fernández-García et al, 2009b; Schares et al, 2009) et ont montré quasiment 100% de similitude entre elles, tout comme avec les espèces de *Besnoitia* spécifiques des chèvres (*B. caprae*), des chevaux et ânes (*B. bennetti*), et des caribous et rennes (*B. tarandi*). L'analyse de la région génomique de l'ARNr a donc une utilité limitée pour la différenciation des espèces de *Besnoitia* (Schares et al., 2009). En outre, trois nouvelles espèces de *Besnoitia* ont été décrites chez les petits mammifères et le cycle évolutif de deux d'entre elles a été clarifié (Dubey et al, 2003b, c; Dubey et Yabsley, 2010). Cependant, les voies de transmission et le cycle évolutif de la besnoitiose des grands mammifères demeurent encore énigmatiques.

B. Morphologie des différents stades parasitaires

1. Les ookystes

Peteshev et son équipe furent les seuls à donner une description morphologique en 1974. Non sporulés, ils sont de forme elliptique et mesurent 11,6-14,2 x 14,2-16 µm. Les ookystes de *Besnoitia* sont très semblables à ceux du genre *Toxoplasma* et du genre *Hammondia* (figure 4). Ils n'ont pas été depuis observés à nouveau.

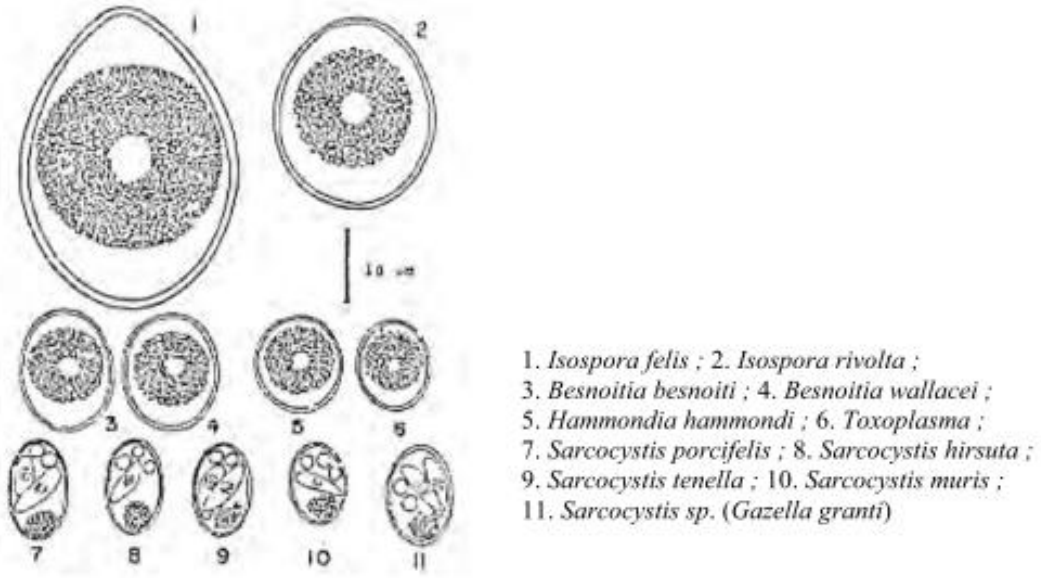


Figure 4 : Représentation schématique d'ookystes de coccidies retrouvées dans les fèces d'un chat ; échelle:10 µm (Dubey et al., 1976)

2. Les tachyzoïtes

Par comparaison aux ookystes, les tachyzoïtes furent décrits initialement 20 ans plus tôt, en 1954 par Pols et son équipe. Ils sont en forme de « banane » ou de « croissant » libre dans le sang ou la lymphe (photo 1), et prennent une forme ovoïde lorsqu'ils sont situés dans les pseudo-kystes (photo 2). Ils mesurent environ 2 x 7 µm (Pols, 1960).

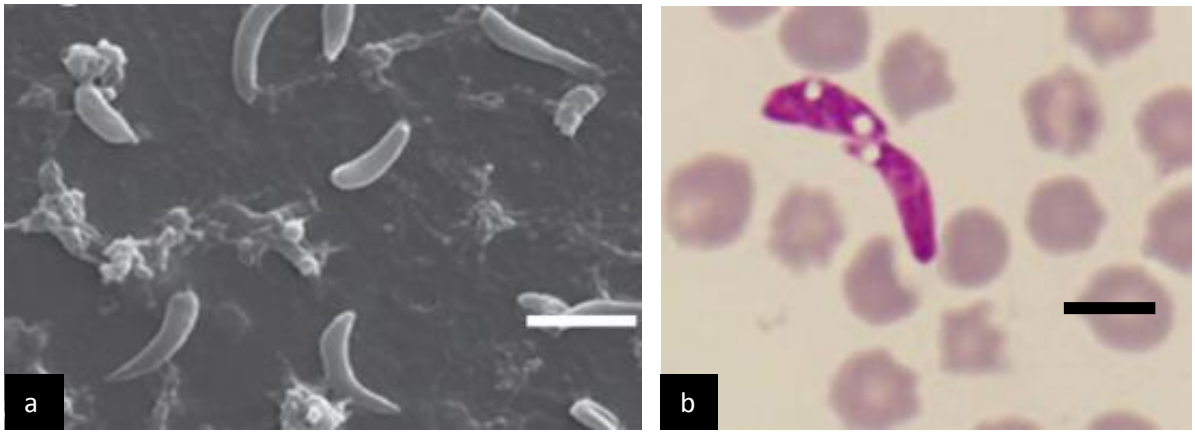


Photo 1 : (a) Tachyzoïtes dans une cellule Vero infectée, observés au microscope électronique à balayage ; échelle : 12 µm (Cortes et al., 2006b) ; (b) Tachyzoïtes libres dans le sang ; échelle : 7 µm (Shkap)

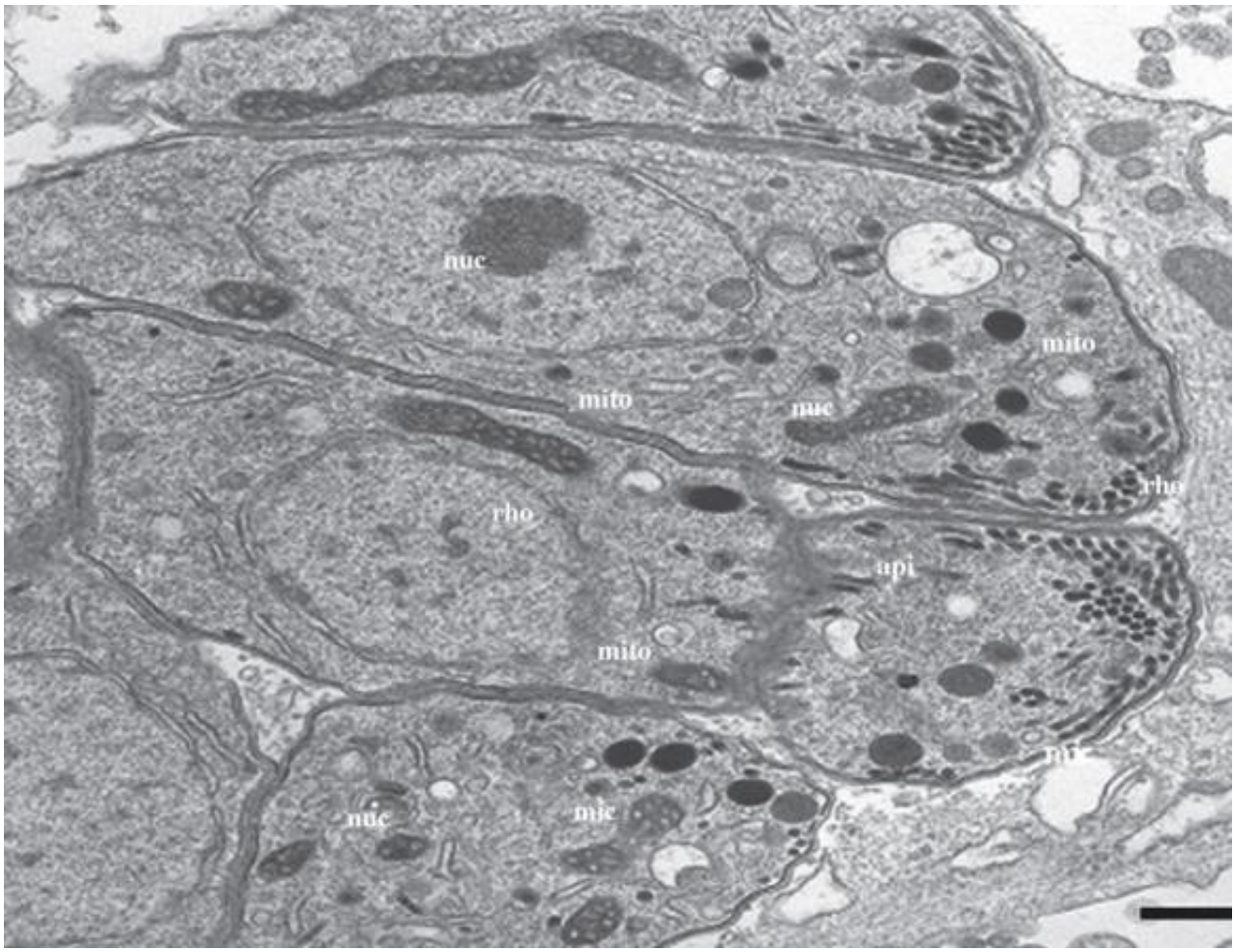


Photo 2 : Tachyzoïtes dans une cellule Vero infectée, observés au microscope électronique à transmission ; échelle : 0,3 µm (Cortes et al., 2006b)

3. Les kystes à bradyzoïtes

Il s'agit de la seule forme parasitaire visible à l'œil nu. Les kystes peuvent mesurer jusqu'à 1,5 mm, mais sont généralement aux alentours de 250-400 µm (Frenkel et al., 2003). Macroscopiquement, on observe de petits points en reliefs punctiformes en tête d'épingle. Microscopiquement, les kystes sont entourés de cellules inflammatoires mononuclées et de fibroblastes, puis de manière centripète on retrouve (figure 5 ; photo 3) :

① une membrane externe ou capsule kystique, zone hyaline formée de collagène qui confère sa forme au kyste.

② une membrane intermédiaire, qui correspond en fait à la membrane de la cellule hôte parasitée.

③ une membrane interne, correspondant à la vacuole parasitophore de la cellule hôte.

④ une multitude de bradyzoïtes, coalescents.

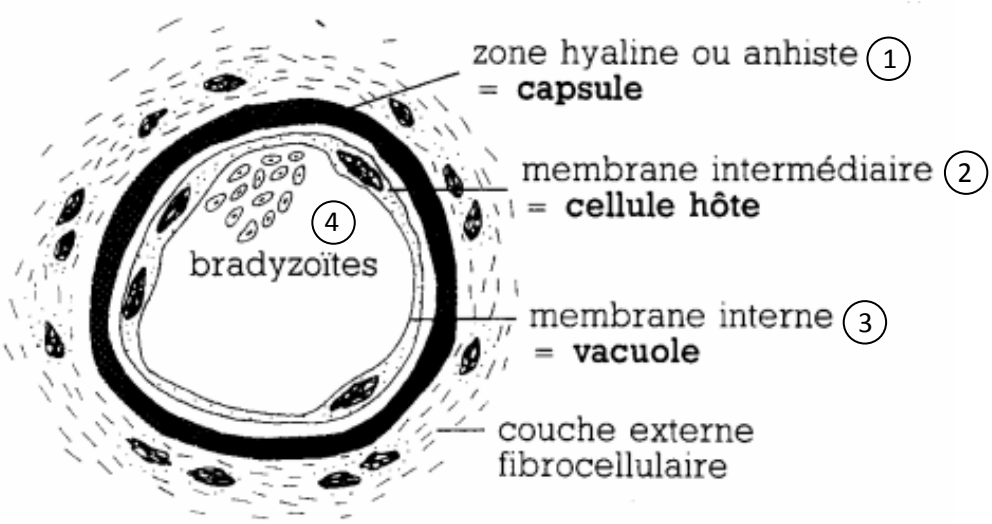


Figure 5 : Réprésentation schématique d'un kyste à bradyzoïte (Franc et al., 1987)

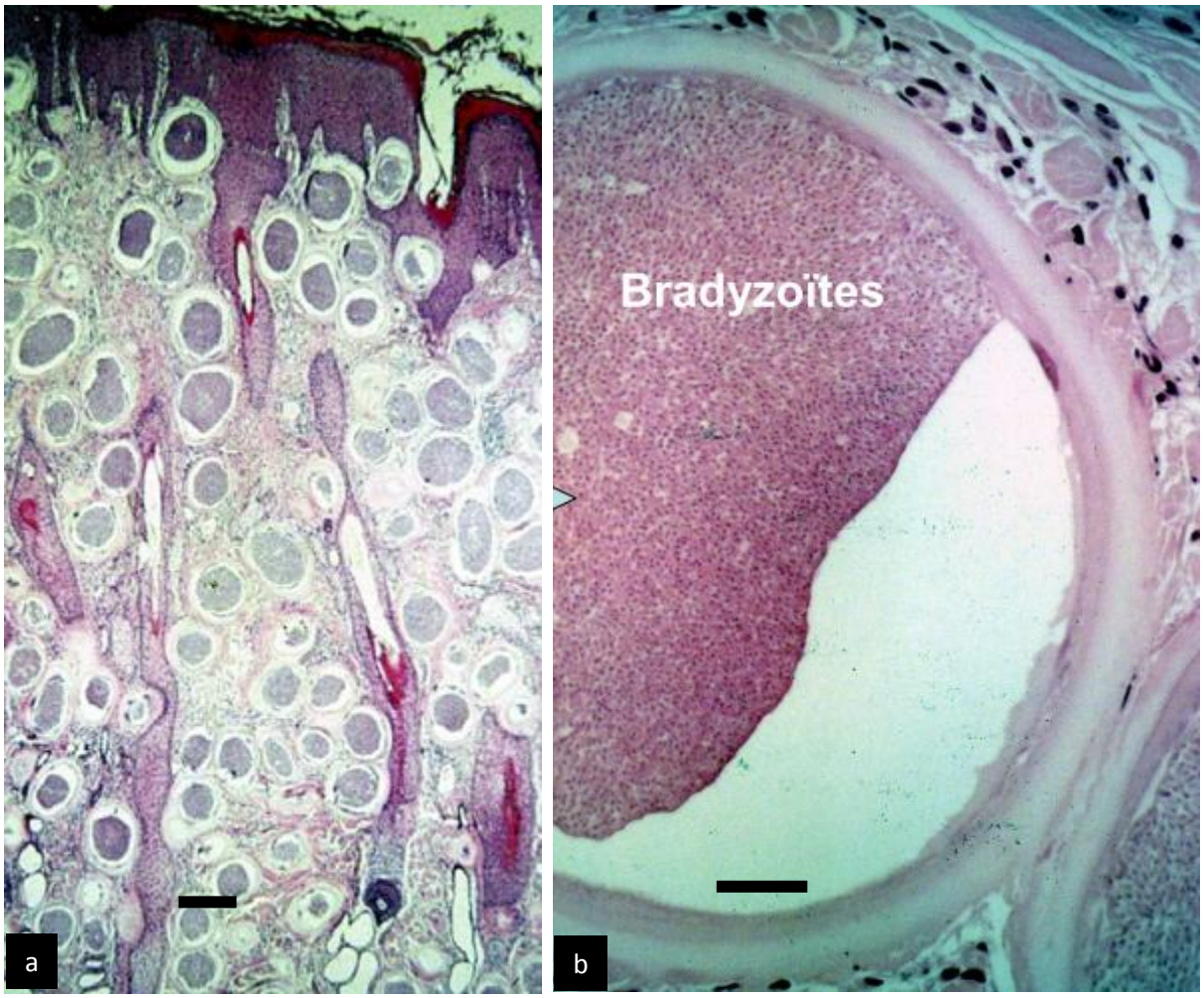


Photo 3 : Coupe histologique de peau montrant de très nombreux kystes de *Besnoitia besnoiti* dans le derme ; (a) échelle : 300 µm ; (b) vue rapprochée sur un kyste ; échelle : 40 µm (Alzieu et al., 2009)

4. Les bradyzoïtes

Décrits pour la première fois en 1912 par Besnoit et Robin, les bradyzoïtes prennent également une forme de banane au cours de la maturation du kyste. Ils mesurent environ 1,9 x 8,4 µm (Ferrié, 1984) (Photo 4).

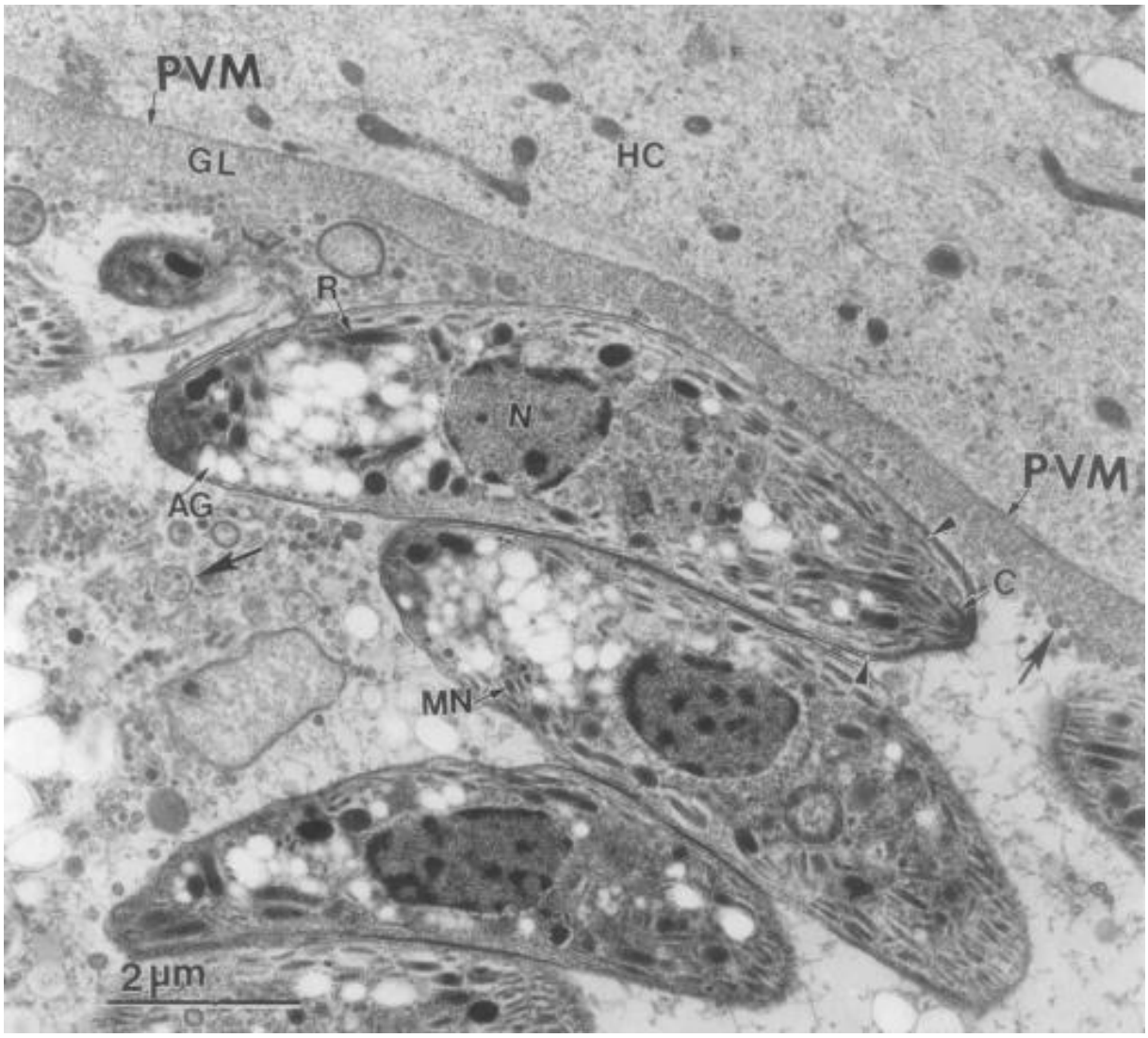


Photo 4 : Bradyzoïtes par observation au microscope électronique à transmission ; PVM : membrane vacuolaire parasitophore, GL : couche granuleuse, MN : micronèmes, R : rhoptries, N : noyau, AG : granules d'amylopectines, HC : cellule hôte (Dubey e al., 2003a)

C. Cycle évolutif

1. Actualités autour du cycle évolutif de *Besnoitia besnoiti*

Bien que les espèces de *Besnoitia* des grands mammifères soient étudiées depuis un siècle maintenant (Besnoit et Robin, 1912), les hôtes définitifs d'un cycle évolutif supposé hétéroxène ne sont toujours pas bien définis. Parmi le genre *Besnoitia*, seulement *B. darlingi, B. wallacei, B. oryctofelisi,* et *B. neotomofelis* ont un cycle biologique connu et où le chat est l'hôte définitif (Dubey et al., 2003a ; Dubey et Yabsley, 2010 ; Frenkel, 1977, Smith et Frenkel, 1977). Pour les autres espèces de *Besnoitia* (*B. bennetti, B. jellisoni, B. caprae, B. tarandi, B. akodoni*) incluant *B. besnoiti*, l'hôte définitif est toujours inconnu (Dubey et al., 2003a,b).

Des cas d'infections expérimentales réalisées par Rommel (1975) en Uganda et Peteshev et al. (1974) au Kazakhstan suggèrent que l'hôte définitif soit le chat. Cependant, leurs résultats ont uniquement montré la présence dans les fèces des félidés d'ookystes non sporulés et non identifiés. Toutes leurs expériences ont été réalisées sans témoins, sans tests sérologiques permettant de confirmer une infection ou bien de différencier les protozoaires proches (tel que *T. gondii* ou *H. hammondi*). Le rôle d'hôte définitif n'a pas pu être confirmé ultérieurement, malgré les recherches de Diesing et al. en 1988, réalisées sur 12 espèces de mammifères carnivores incluant le chat domestique, six espèces de reptiles, et une espèce d'oiseau charognard. Aucun de ces animaux n'a excrété d'ookystes après l'ingestion de tissus contenant des kystes à bradyzoïtes isolés dans deux endroits différents (Israël et Afrique du sud).

Face à ce mystère, Cortes et al. (2006) ont réessayé les expérimentations mais celles-ci n'ont donné aucun résultat probant. De même pour l'équipe de Basso et al. en 2011, qui a inoculé *B. besnoiti*, provenant de bovins infectés en Allemagne, à des animaux domestiques (chat, chien, lapin, rongeurs). Les résultats diagnostiques et sérologiques montrent que les isolements de *B. besnoiti* peuvent infecter les chats, les lapins, et les rongeurs ; cependant, une persistance du parasite est démontrée uniquement chez le campagnol. Bien que des efforts considérables aient été déployés pour élucider le cycle biologique de *B. besnoiti*, aucune étude d'infection expérimentale n'a été menée en faisant ingérer des espèces de petits mammifères infectés (comme des lapins ou des rongeurs) à des carnivores. L'hypothèse d'un cycle hétéroxène typique des coccidies demande donc à être vérifiée.

On ne sait pas pour le moment si des isolements de *B. besnoiti* provenant de régions géographiquement différentes proviennent d'hôtes d'espèces différentes. Cependant, aucun hôte naturel intermédiaire autre que le bovin n'a été décrit pour *B. besnoiti* (Jacquiet et al., 2010). Il a été montré que les lapins peuvent être infectés expérimentalement mais aucune étude n'a jamais confirmé de cas naturel sauvage. Par contre, deux cas de besnoitiose naturelle ont pu être décrits chez des lapins domestiques. Basson et al. (1970) et Bigalke (1967, 1968) ont pu reproduire les phases cliniques de la besnoitiose chez des lapins en inoculant *B. besnoiti*.

Des études expérimentales sur des ongulés et sur des animaux de laboratoire ont permis d'établir que la transmission directe des bradyzoïtes et tachyzoïtes entre hôtes intermédiaires se ferait par l'intermédiaire d'insectes piqueurs vecteurs mécaniques (Basso et al., 2011 ; Bigalke, 1967, 1968, 1981 ; Liénard et al., 2012). Ce cycle monoxène de bovin à bovin, serait d'importance capitale (Alzieu et al., 2000).

2. Les oiseaux migrateurs comme hôtes intermédiaires et définitifs ?

En examinant les foyers enzootiques de la besnoitiose bovine (par exemple les Pyrénées en France et en Espagne, le sud du Portugal, l'Israël, le Nigeria, le Soudan, le Kenya et l'Afrique du Sud), il est curieux que certaines de ces zones correspondent à des points de rassemblement importants des oiseaux migrateurs durant leur migration d'Afrique jusqu'en Eurasie (Elphick, 2007). Il reste à démontrer que les oiseaux peuvent être infectés par des espèces de *Besnoitia* en tant qu'hôtes intermédiaires et définitifs, et joueraient un rôle de vecteurs sur longues distances, de manière comparable à *T. gondii* (Lehmann et al., 2006). Cependant, les travaux de Rommel (1975) d'une part, et de Diesing (1988) d'autre part, n'ont pas permis l'infection du Marabout d'Afrique (*Leptoptilos crumeniferus*) et du Vautour africain (*Gyps africanus*), oiseaux charognards et sédentaires africains. Les rapaces migrateurs, cependant, n'ont pas été étudiés. Des kystes morphologiquement très similaires sont induits par d'autres parasites apicomplexes chez les oiseaux. Cependant, aucune preuve génétique n'a été fournie quant à l'étiologie parasitaire et ces cas doivent donc être considérés prudemment (Olias et al., 2011). D'autres protozoaires très proches des *Besnoitia* tels que *T. gondii* et *N. caninum* peuvent infecter une grande variété d'espèces aviaires (Costa et al, 2008 ; Dubey, 2002 ; Furuta et al, 2007 ; Gondim et al, 2010). Par conséquent, un cycle biologique impliquant les oiseaux comme hôtes intermédiaires pourrait être envisagé (Olias et al., 2011).

3. Evolution du parasite

a. Cycle épidémiologique de Besnoitia besnoiti : schématisation

Le cycle épidémiologique de *B. besnoiti* fait appel à un cycle historique hétéroxène de chat à bovin d'importance mineure, et à un cycle homoxène de bovin à bovin d'importance majeure (figure 6).

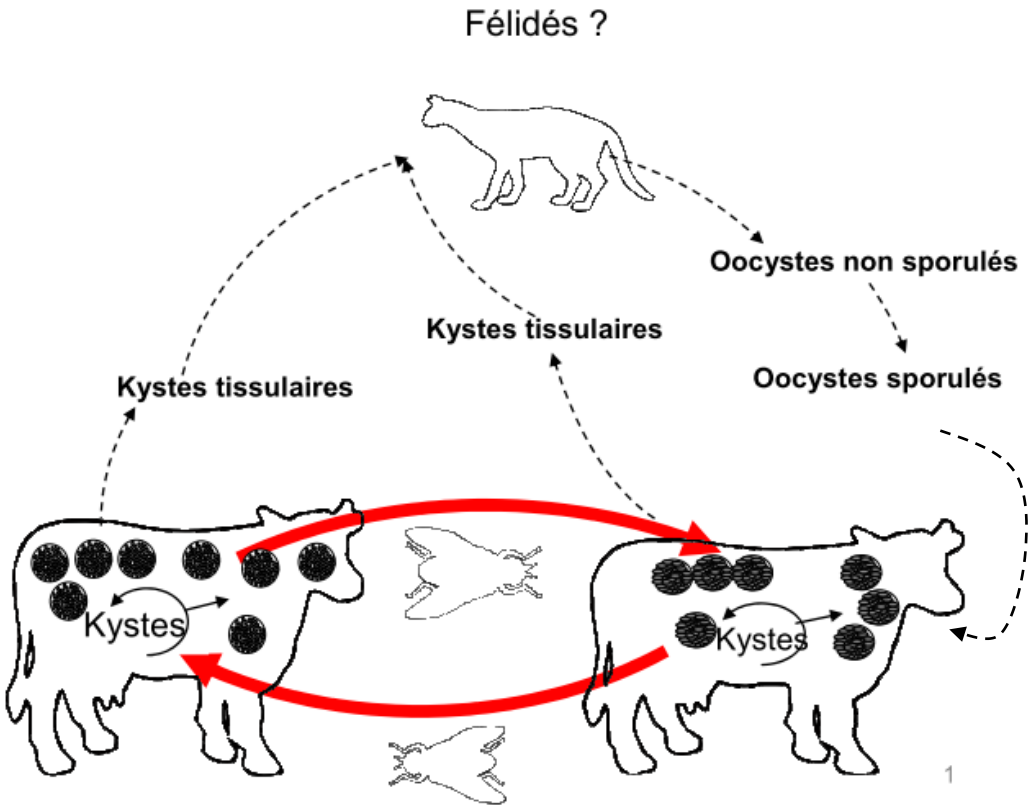


Figure 6 : Les deux cycles possibles dans la besnoitiose bovine (Alzieu et al., 2010)

b. Cycle hétéroxène de chat à bovin, d'importance mineure

Le parasite *Besnoitia besnoiti* est un protozoaire évoluant selon un cycle de type coccidien (Ferrié, 1984) :

Chez l'hôte définitif, après ingestion de kystes à bradyzoïtes, la paroi des kystes se lyserait, libérant ainsi les bradyzoïtes dans la lumière intestinale. Ils se transformeraient alors en sporozoïtes qui évolueraient de manière asexuée par schizogonie. Ils pénètreraient ensuite les entérocytes puis continueraient leur transformation en passant par les stades trophozoïtes, schizontes et mérozoïtes. Ces derniers seraient alors libérés dans la lumière digestive (Ferrié, 1984 ; Franc et al., 1987). Commencerait alors la phase de reproduction sexuée ou gamétogonie : les mérozoïtes infecteraient de nouveaux les cellules épithéliales et donneraient des gamétocytes, évoluant à leur tour soit en macrogamétocytes (forme femelle), soit en microgamétocyte (forme mâle). La fécondation d'un macrogamétocyte par un

microgamétocyte aboutirait à un œuf, entouré d'une paroi, que l'on appelle ookyste. Après 6 à 8 jours (période prépatente), les œufs seraient éliminés par les fèces.

Une fois dans le milieu extérieur, les ookystes devraient acquérir leur pouvoir infectant par sporulation. Cette phase de maturation se réaliserait à température ambiante et nécessiterait 2 à 4 jours au terme desquels les ookystes deviendraient 2 sporocystes renfermant chacun 4 sporozoïtes (Ferrié, 1984 ; Franc et al., 1987).

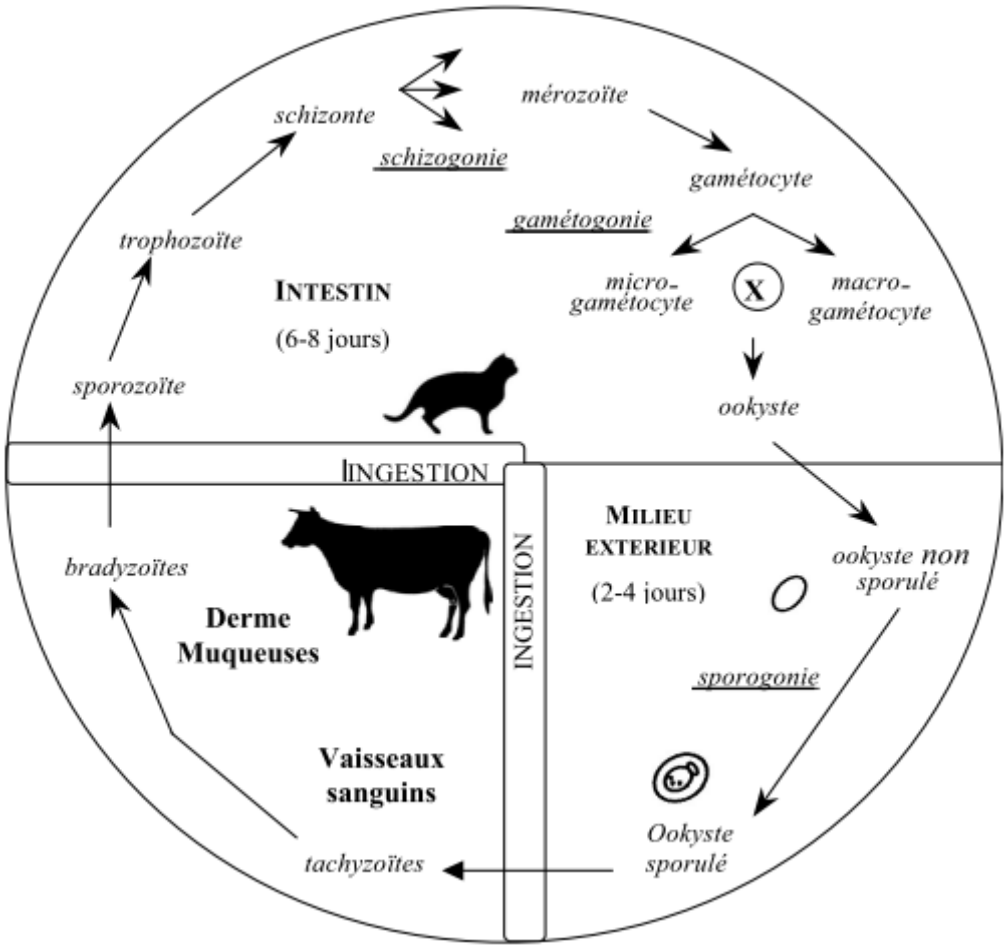


Figure 7 : Cycle hétéroxène Chat – Bovin (Genest, 2008)

Enfin, le bovin se contaminerait par ingestion d'ookystes sporulés suivant l'excrétion fécale par le chat (figure 7). Une fois dans la lumière digestive, les ookystes lysés libèreraient les sporozoïtes. Ces derniers envahissent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, s'y multiplient et s'accumulent. On a alors formation de pseudo-kystes renfermant de nombreux tachyzoïtes qui se divisent rapidement. Ils sont ensuite libérés dans la circulation sanguine après éclatement de la cellule hôte. Les tachyzoïtes infectent diverses cellules : cellules endothéliales, fibroblastes et histiocytes du tissu conjonctif (Ferrié, 1984 ; Franc et al., 1987). Les parasites évoluent en bradyzoïtes (=division lente) contenu dans des kystes intracellulaires du fait de la pression du système immunitaire. Ces kystes deviennent matures en dix semaines environ et persisteraient une dizaine d'années (Alzieu et al., 2007b).

c. Cycle homoxène de bovin à bovin, d'importance capitale

Les bradyzoïtes des kystes cutanés peuvent être transmis mécaniquement d'un bovin infecté à un bovin sain par l'intermédiaire d'insectes piqueurs, Tabanidés ou Stomoxyinés (Bigalke, 1968), tout comme par une aiguille souillée lors d'injections en série (thérapies ou vaccinations de groupe) ou par contact direct. Ce cycle monoxène apparaît désormais comme dominant (figure 8).

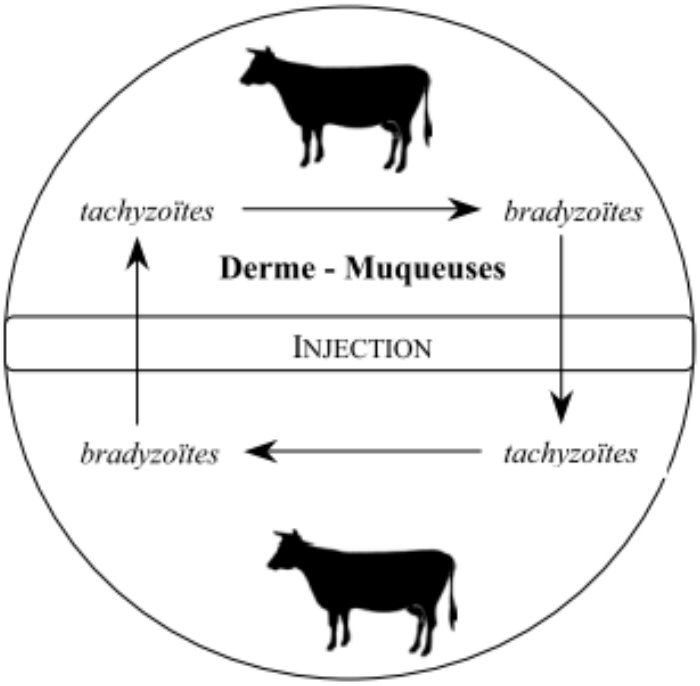


Figure 8 : Cycle homoxène Bovin – Bovin (Genest, 2008)

III. EPIDEMIOLOGIE

A. Epidémiologie descriptive

1. Répartition géographique

a. Distribution à l'échelle mondiale

La besnoitiose bovine à *B. besnoiti* est répartie dans de nombreux pays d'Afrique sub-saharienne (figure 9) : Nigeria, Cameroun, Tchad, Soudan, Ouganda, Kenya, Tanzanie, Congo, Angola, Namibie, Botswana, et Afrique du Sud (Pols, 1960 ; Bigalke et al., 1967 ; Franc, 1987) ; au Moyen Orient : Israël et Kazakhstan ; en Asie : Chine et Corée du Sud (Lee et al., 1970 ; Peteshev et al., 1974 ; Wang et Liu, 1987) ; et en Amérique latine : Vénézuela (Olias et al., 2011). En Europe, la besnoitiose bovine est enzootique dans trois pays du bassin méditerranéen : Portugal (Cortes et al., 2005), Espagne (Irigoien et al., 2000) et le sud de la France (Besnoit et Robin, 1912 ; Alzieu et al., 2007a). Ce n'est que récemment que la maladie chez les bovins a été reconnue comme émergente en Europe par l'European Food Safety Authority (EFSA, 2010), depuis que plusieurs cas sporadiques ont été signalés en Italie (Agosti et al., 1994 ; Gollnick et al., 2010), en Allemagne (Mehlhorn et al., 2009 ; Schares et al., 2009), et pour la première fois en Suisse (Lesser et al., 2012).

La besnoitiose à *B. tarandi* se retrouve préférentiellement au Canada, en Alaska (Etats-Unis), en Suède, en Finlande, et en Russie (Olias et al., 2011).

La besnoitiose à *B. caprae* est quant à elle répartie entre le Nigeria, le Kenya, et l'Iran (Olias et al., 2011).

Enfin, la besnoitiose à *B. bennetti* est présente aux Etats-Unis, au Soudan, en Afrique du Sud et a été signalée historiquement en France (Olias et al., 2011).

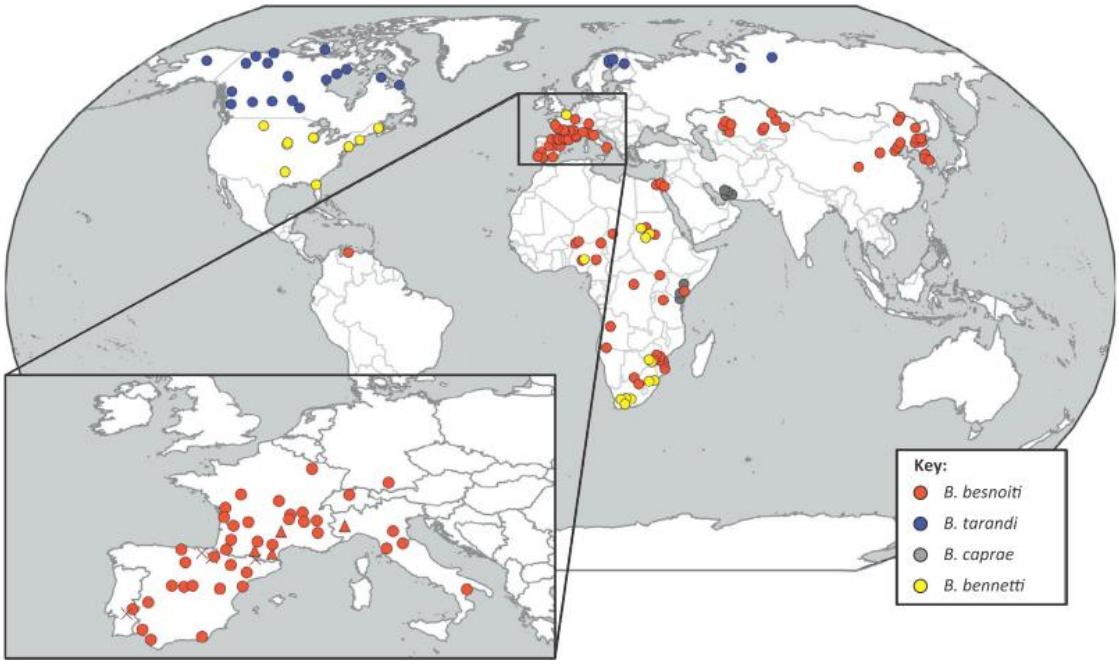


Figure 9 : Répartition mondiale des différentes espèces de *Besnoitia*. Rouge : *Besnoitia besnoiti* ; bleu : *Besnoitia tarandi* ; jaune : *Besnoitia bennetti* ; gris : *Besnoitia caprae*. Agrandissement : Expansion chronologique de *B. besnoiti* en Europe. Croix : avant 1900 ; triangles : 1991–2000 ; cercles : 2001–2012. (Álvarez-García et al., 2013)

b. Distribution à l'échelle nationale (Alzieu et al., 2007a ; Jacquiet et al., 2010)

Entre 1800 et 1960, la besnoitiose était endémique dans de nombreuses zones du Sud-ouest de la France (bordure sud du Massif central, hautes vallées de l'Aude et de l'Ariège, Gers, Hautes- Pyrénées, Adour, Ouest-Gironde).

Dans les années 1970-1980, elle est restée limitée aux hautes vallées pyrénéennes de l'Aude et de l'Ariège.

A partir des années 90, elle s'est étendue aux régions voisines.

Dès la fin du 20e siècle et le début du 21e, on observe une augmentation du nombre de foyers en Piémont pyrénéen, une émergence de cas au nord du Massif Central, en Pays de la Loire, et dans le Massif Alpin où la maladie est endémique dans sa partie centrale et méridionale.

Plus récemment, la besnoitiose a touché la bordure Sud, Sud-est et Est du Massif Central.

En 2010, il a été observé des cas dans le Nord du Massif Central, dans la Bresse et dans le Nord des Alpes.

Aujourd'hui, après avoir longtemps été installée au Sud d'une ligne Nantes-Lyon, la besnoitiose progresse selon la direction Nord-est (figure 10).

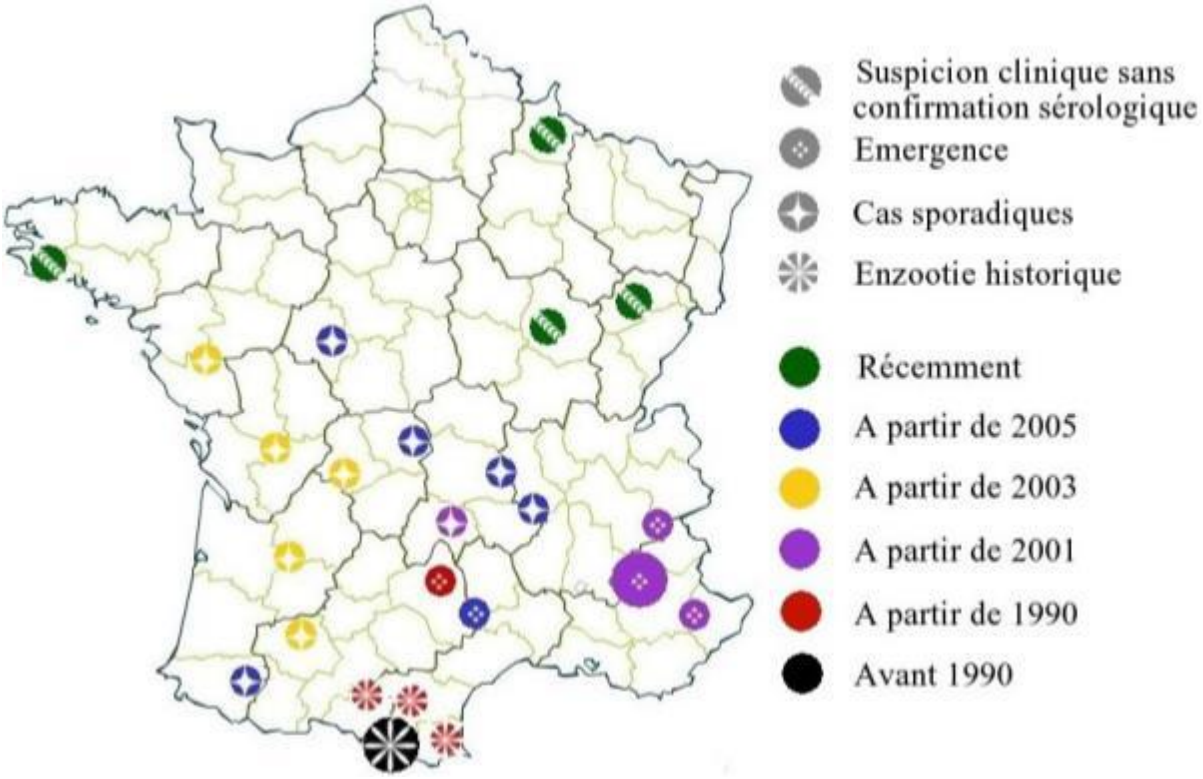


Figure 10 : Répartition géographique des cas cliniques de besnoitiose bovine, d'après Alzieu et al., 2007b, 2011.

2. Facteurs de sensibilité et de réceptivité

La besnoitiose bovine à *B. besnoiti* n'affecte que les bovins qui sont réceptifs et sensibles.

a. L'âge

La présence de kystes à bradyzoïtes dans les tissus de jeunes veaux âgés de 4 à 5 mois montre que tous les bovins, quel que soit leur âge, sont réceptifs. Par contre, ils ne sont pas forcément sensibles, c'est le cas des jeunes bovins jusqu'à l'âge d'un an. La plupart du temps, il faut attendre au-delà d'un an pour que la maladie au sens « clinique » du terme survienne, mais cela reste assez variable (figure 11). Aussi bien en zone endémique qu'en zone d'émergence récente, des enquêtes ont permis de confirmer l'expression clinique préférentiellement chez les bovins âgés de 1 à 4 ans (Alzieu et al., 2007b, 2009, 2010 ; Legrand, 2003).

b. Le sexe

Les formes cliniques les plus sévères touchent préférentiellement les taureaux, avec un taux de létalité supérieur au reste de la population (Alzieu et al., 2007a ; Ferrié, 1984 ; Legrand, 2003). Le parasite atteint fréquemment les testicules, où il y engendre des lésions souvent irréversibles (foyers de nécrose, fibrose et calcification). Plus de la moitié des taureaux atteints cliniquement deviennent stériles, même avec un traitement adapté. Alors que les taureaux atteints de manière subclinique restent fertiles. Chez les femelles, des kystes à bradyzoïtes ont pu être retrouvés dans les muqueuses de l'appareil génital femelle (vulve, vagin, utérus), mais cela n'affecterait pas la fécondité (Ferrié, 1984 ; Legrand, 2003).

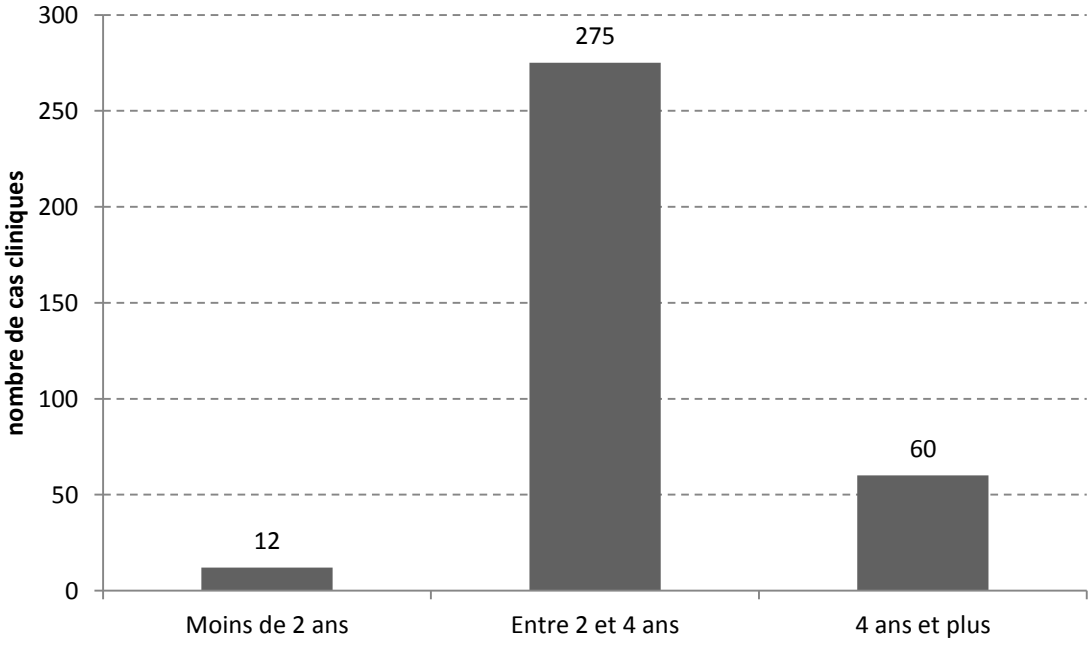


Figure 11 : Répartition des cas de besnoitiose en fonction de l'âge des bovins (Legrand, 2003)

c. *La race* *(Alzieu et al., 2010 ; Legrand, 2003)*

Aucune prédisposition raciale n'a été jusqu'ici démontrée. Les sensibilités soupçonnées seraient plutôt liées au mode d'élevage.

d. *Le mode d'élevage* *(Jacquiet et al., 2010 ; Legrand, 2003)*

Legrand (2003) distingue trois modes d'élevage à risque pour la contamination :

La transhumance est un facteur de risque majeur dans la réceptivité des bovins. En effet, il s'agit du regroupement d'animaux provenant de divers cheptels, dont le statut sanitaire diffère, auquel s'ajoute une abondance d'insectes piqueurs et vecteurs de la besnoitiose.

L'élevage allaitant dit « sédentaire », non transhumant, où la transmission du parasite se réalise par l'achat de bovins porteurs, ou bien par le biais d'insectes vecteurs qui se propagent à distance d'élevage en élevage.

L'élevage laitier « sédentaire », où les contaminations prennent des allures épizootiques (quelques animaux atteints), sans aucune explication satisfaisante. Ce dernier mode d'élevage serait même assez rarement touché. Toutefois, comme pour l'élevage allaitant « sédentaire », l'introduction d'un animal infecté est un facteur de risque non négligeable.

e. *La saison*

Il était communément admis jusqu'à la fin du 20ème siècle que le nombre de cas cliniques de besnoitiose était concomitant aux pullulations estivales des insectes vecteurs. L'expression saisonnière de la maladie prenait parfois des allures pseudo-épizootiques, avec un maximum d'incidence de juillet à septembre (80% des cas cliniques). On observait tout de même quelques cas cliniques en hiver (Legrand, 2003). Les formes inapparentes n'étaient pas possibles à déceler comme actuellement. A partir des années 2000, les travaux du FRGDS PACA dans le Sud du Massif Alpin, ont permis de relever un changement important de cette saisonnalité (figure 12) : au départ elle était proche de celle des zones traditionnelles d'enzootie, puis à partir de 2004, un certain nombre de cas ont été recensés dès le début du printemps alors que les bovins étaient encore en stabulation. On était face à un pic de printemps, et à un pic d'été-automne. Les contaminations précoces de printemps sont sans nul doute liées à l'abondance des populations de *Stomoxys calcitrans* en bâtiment. Les contaminations d'été (avec cas cliniques) sont liées à l'augmentation massive des populations de stomoxes, d'*Haematobia irritans* et de Tabanidés (Jacquiet et al., 2009). Les taons seraient des vecteurs plus efficaces pour transmettre la maladie que les stomoxes (Bigalke, 1968). Seuls les mois d'hiver présentent très peu de cas cliniques. L'extension de la saisonnalité va avoir pour conséquence un changement de stratégie de contrôle des insectes vecteurs (Alzieu et al., 2011).

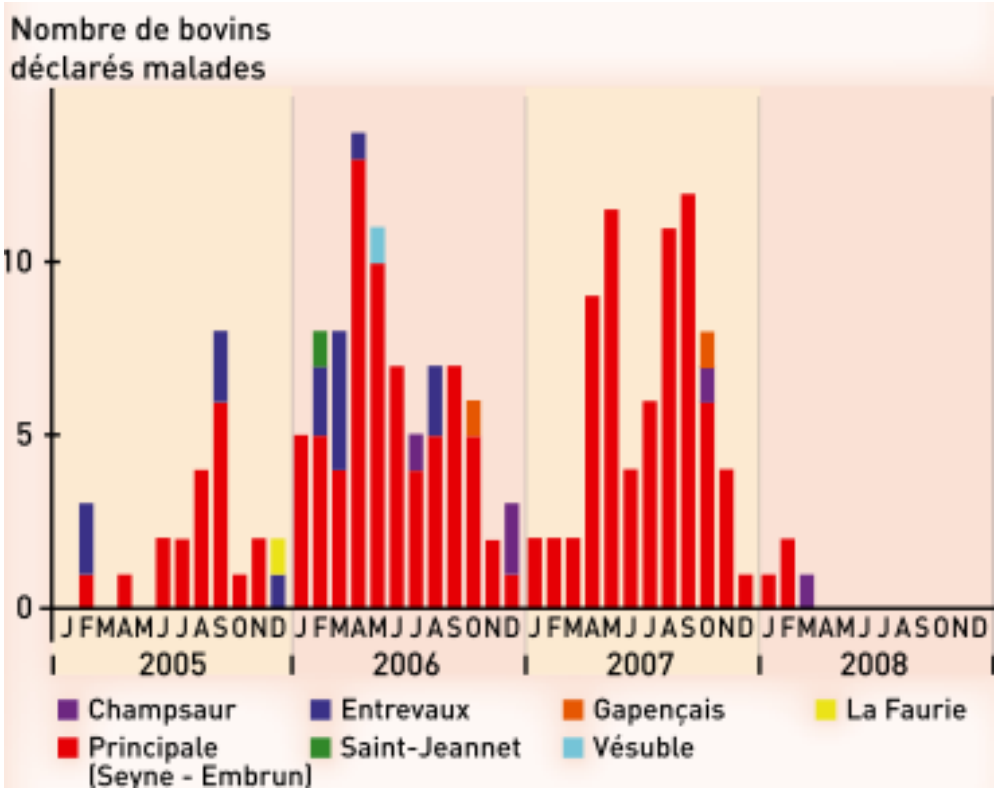


Figure 12 : Saisonnalité étendue des cas cliniques en région Provence-Alpes Côte d'Azur de 2005 à 2008 (FRGDS PACA, 2008)

3. Prévalence et incidence

En zone d'enzootie, l'infection est répandue dans les populations de bovins mais la population de bêtes infectées qui développent la maladie est beaucoup moins importante (Pols, 1960 ; Bigalke, 1968 ; Legrand, 2003 ; Cortes et al., 2006b ; Alzieu et al., 2007b). Après contamination par *B. besnoiti*, on peut définir trois formes de clinique différentes : une petite proportion des animaux développe les signes cliniques typiques de la maladie, une plus grande proportion compte des individus séropositifs présentant des kystes scléro-conjonctivaux, et la plus grande partie est représentée par les animaux séropositifs asymptomatiques (Pols, 1960 ; Bigalke, 1968 ; Goldman et Pipano, 1983 ; Ferrié, 1984 ; Freudiger, 2008). Dans les zones enzootiques comme le sud-ouest de la France, la prévalence de cas cliniques se situe entre 1 et 10% par an, et l'incidence se situe entre 2 et 5% (Legrand, 2003). Dans les zones épizootiques où la maladie émerge comme dans l'est de la France, plus de 15 à 20% des animaux nouvellement contaminés présentent les signes typiques de la maladie (Jacquiet et al., 2009). Dans l'ouest de la France, les cas cliniques restent très sporadiques mais la proportion d'individus séropositifs est élevée, voire souvent très élevée (> 50%) (Berhault, 2008 ; Genest, 2008).

B. Epidémiologie analytique

Le caractère contagieux de la besnoitiose bovine est illustré par l'allure épizootique qu'elle peut prendre dans certaines régions. Une fois installée dans un élevage, l'infection à *B. besnoiti* se répand au sein du troupeau comme cela a pu être observé dans une étude sérologique à long terme d'une cohorte de 57 animaux suivie pendant plus d'un an (Liénard et al., 2011). La séroprévalence au sein de cette cohorte a augmenté de 30 à 89.5%.

Les modes de transmission du parasite sont étudiés depuis de nombreuses années. Historiquement, des tachyzoïtes sanguins ou des bradyzoïtes cutanés ont été transmis avec succès d'un animal infecté à un autre animal receveur, respectivement par transfusion de grands volumes de sang bovin contaminé, ou par transmission mécanique par piqûres de tabanidés et de *Stomoxys calcitrans*, plus communément appelée la mouche d'étable (Cuillé et al., 1936 ; Pols, 1960 ; Bigalke, 1968).

1. Transmission par voie transcutanée

a. Via les arthropodes piqueurs

Les arthropodes, hématophages ou non, ont longtemps été étudiés comme vecteurs de transmission potentiels des espèces de *Besnoitia* (Cuillé et al, 1936 ; Pols, 1960 ; Bigalke, 1968). En effet, la localisation de kystes à bradyzoïtes de *Besnoitia* directement sous la peau et dans les régions anatomiques comme la sclère, la conjonctive, le vestibule du vagin et la vulve, la mamelle, les parties basses des membres et les cavités nasales sont facilement accessibles aux pièces buccales d'une grande partie des arthropodes hématophages (Bigalke, 1968; Mehlhorn et al, 2009).

Plusieurs facteurs importent dans l'efficacité de transmission mécanique du parasite :

① L'espèce d'insecte hématophage et le nombre d'insectes

Il a été démontré expérimentalement que les tabanidés (*Tabanus* sp. *;* photo 5), les moustiques (*Culex* sp. ; *Aedes* sp. *;* photo 9), les mouches tsé-tsé (*Glossina* sp. *;* photo 8) et les mouches d'étable (*Stomoxys calcitrans* ; photo 6) peuvent transmettre mécaniquement *B. besnoiti* entre les bovins, mais aussi entre les bovins et les lapins (Bigalke, 1960, 1968).

Le parasite est rapidement détruit à l'intérieur de l'intestin moyen du vecteur, interdisant toute persistance à long terme de l'agent pathogène. En revanche, *B. besnoiti* peut survivre dans les pièces buccales du vecteur pendant 24 heures environ chez certains tabanidés, mais pas plus de quelques heures chez les stomoxes.

D'autres arthropodes tels que les moustiques, les mouches plates (*Hippobosca* sp. ; photo 12), les tiques et des espèces non piqueuses comme les mouches domestiques (*Musca domestica* ; photo 13) ont été suggérés comme vecteurs, mais cette hypothèse n'a pas encore été démontrée (Bigalke, 1968; Pols, 1960).

Des investigations pourraient être également requises concernant *Culicoïdes* sp. (photo 10) et les simulies (*Simulium sp.* ; photo 11) car ces deux groupes d'espèces sont des vecteurs

compétents biologiques et mécaniques de plusieurs autres maladies virales et parasitaires d'importance vétérinaire (Mullen et Durden, 2009).

Les tabanidés semblent être plus compétents que les mouches d'étables. En effet, le volume des pièces buccales de *Stomoxys calcitrans* est 32 fois plus petit que celui des tabanidés, respectivement 0,4 ml et 12,5 ml (Liénard et al., 2012). Plus de 52 000 piqûres de *Stomoxys calcitrans* sont nécessaires pour provoquer l'infection, alors que seulement 3 piqûres de taons suffisent (Bigalke, 1968). De plus, les risques de contamination des pièces buccales de l'insecte dépendent de la profondeur de pénétration et du type de plaie produite ; encore une fois les tabanidés ont l'avantage par rapport aux stomoxes (Bigalke, 1968).

Récemment, une étude menée en laboratoire utilisant la PCR quantitative et l'immunofluorescence directe par Liénard et al. (2012) a permis de confirmer la capacité de transfert mécanique du parasite par *S. calcitrans*, depuis une génisse en phase chronique de besnoitiose et présentant de nombreux kystes cutanés à bradyzoïtes à un nourrisseur artificiel sur membrane, et puisse transmettre mécaniquement ce parasite.

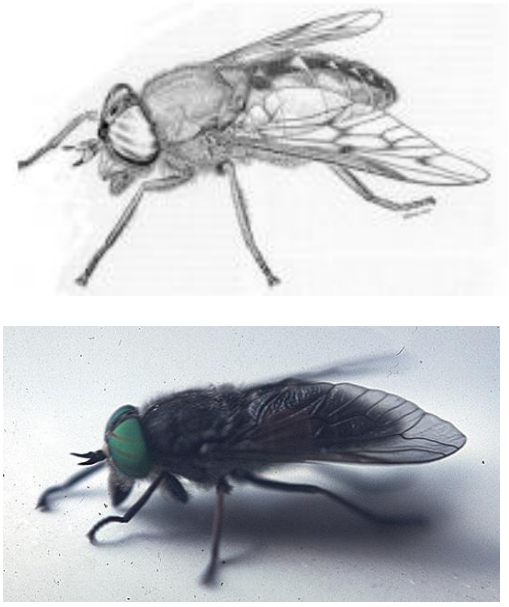


Photo 5
***Tabanus* sp. (Taon)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 4 : Diptères brachycères orthorrhaphes, 2009

Photo 6
***Stomoxys calcitrans* (Mouche d'étable)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 7 : Diptères brachycères cyclorrhaphes calyptères, 2009

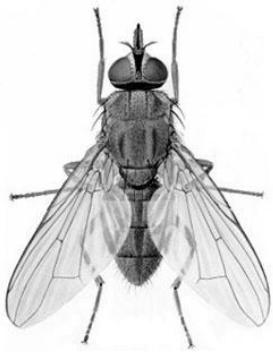
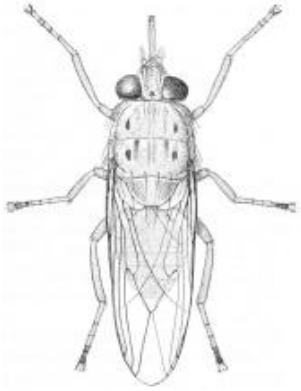


Photo 7
***Haematobia irritans* (Mouche des cornes)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 7 : Diptères brachycères cyclorrhaphes calyptères, 2009



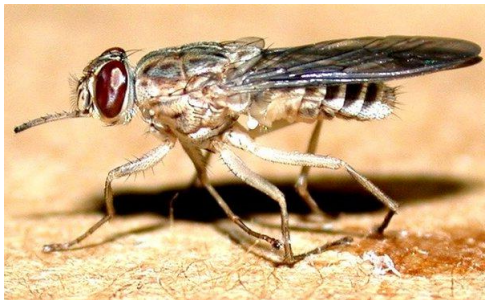


Photo 8
***Glossina* sp. (Mouche tsé-tsé)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 7 : Diptères brachycères cyclorrhaphes calyptères, 2009

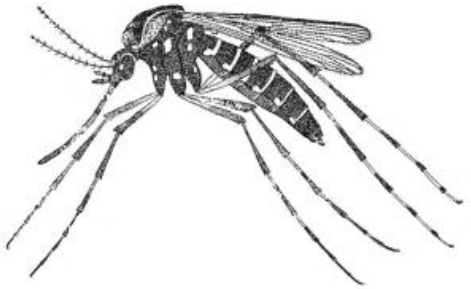


Photo 9
***Aedes* sp. (Moustique)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 3 : Diptères, présentation générale, les nématocères, 2009

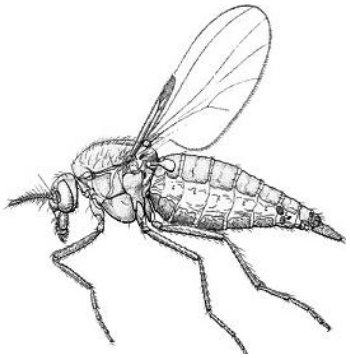


Photo 10
***Culicoïdes* sp. (Moucheron piqueur)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 3 : Diptères, présentation générale, les nématocères, 2009

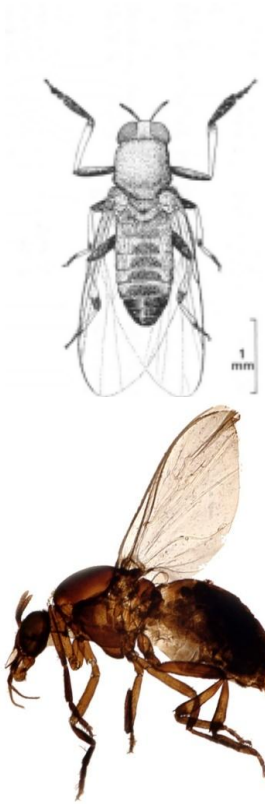


Photo 11
***Simulium* sp. (Mouche noire)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 3 : Diptères, présentation générale, les nématocères, 2009

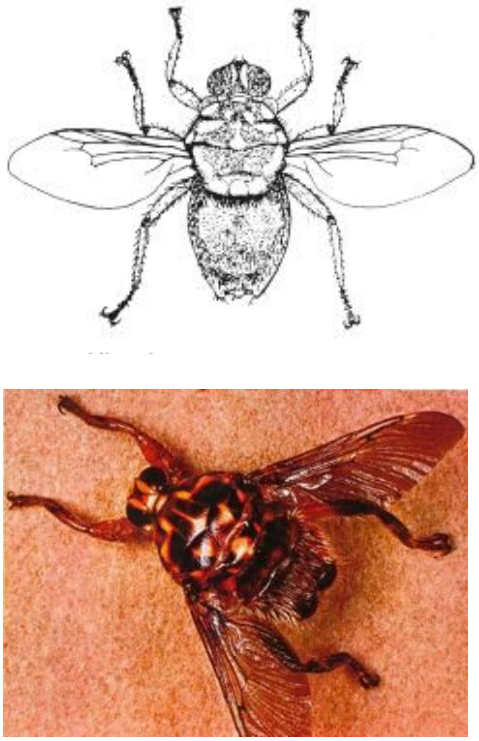


Photo 12
***Hippobosca* sp. (Mouche plate)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 5 : Diptères brachycères cyclorrhaphes pupipares,2009

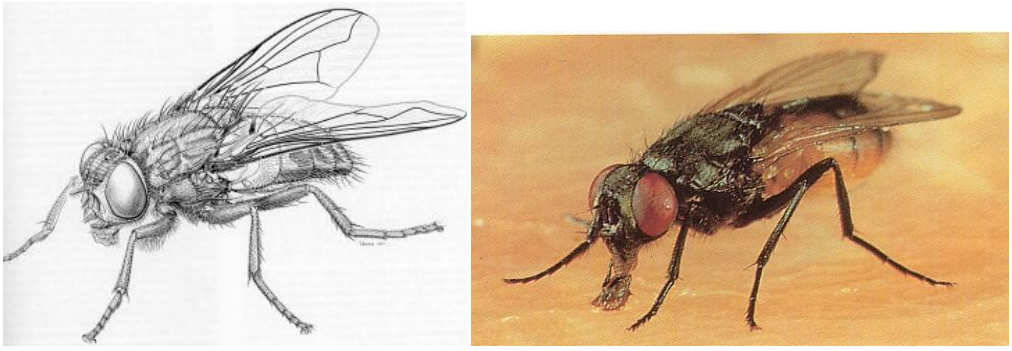


Photo 13
***Musca domestica* (Mouche domestique)**

Réf. : Service de Parasitologie ENVT, Entomologie médicale, Fiche 7 : Diptères brachycères cyclorrhaphes calyptères, 2009

② Le comportement de l'insecte : type de vol et localisations des piqûres

Selon une étude menée par Barros et Foil (2007) aux États-Unis, certaines espèces de Tabanidés cherchent à compléter un repas de sang interrompu sur un hôte à proximité immédiate de l'animal qui les a chassés. La distance maximale que ces insectes feraient dans la plupart des cas pour gagner un nouvel hôte n'excéderait pas dix mètres. Ce comportement pourrait favoriser la transmission intra-troupeau et freinerait la transmission inter-troupeau, même si celle-ci n'est pas exclue pour autant.

De la même manière, d'après Schofield et Torr (2002) et Doyle et al. (2011), *Stomoxys calcitrans* possède des pièces buccales de grande taille et une piqûre douloureuse comme les tabanidés, ce qui provoque des réactions de défense de la part des bovins, qui interrompent les repas de sang. Les mouches d'étable vont alors achever leur repas sur les animaux proches, et assureraient ainsi une transmission mécanique du parasite. La probabilité pour un insecte d'être dérangé durant son repas dépend de la douleur de la piqûre.

Au niveau de la localisation des piqûres, les mouches *tsé-tsé* piquent plutôt sur les membres et l'abdomen, les mouches plates sur la région périnéale, les stomoxes sur les parties basses des membres, les taons au niveau du poitrail ou des épaules, les espèces *Siphona* sur le bas du dos, et les simulies plutôt sur la tête, les membres et l'abdomen (Lapage, 1962).

③ La dynamique saisonnière

Les études récentes menées par Liénard et al. (2011) montrent que les stomoxes adultes ont une activité « étalée » dans le temps. On en retrouve en pâtures de mai à octobre (pic de population) dans le Sud-Ouest français (certaines fois jusqu'à mi-décembre), et à l'intérieur des étables en fin d'hiver - début de printemps, soit avant la mise à l'herbe mais en quantité moins importante (Duvallet et Jacquiet, observations personnelles). Au contraire, l'activité des tabanidés est plus courte, centrée sur les mois de juin, juillet, août. Si on compare ces résultats avec ceux cités précédemment, comme quoi les taons possèdent un volume de pièces buccales 32 fois supérieur à celui des stomoxes, et que la taille de l'inoculum parasitaire a une importance dans le déclenchement des signes cliniques, alors on pourrait admettre que la saisonnalité des populations de taons (juin, juillet, août) pourrait expliquer le nombre important de cas cliniques estivaux de besnoitiose dans les régions d'enzootie comme dans les zones d'épizootie. Les stomoxes quant à eux auraient une action prolongée expliquant des contaminations de faible intensité (Alzieu et al., 2011).

b. Via le matériel d'injection

Si l'on compare l'insecte piqueur avec du matériel vétérinaire, l'insecte interviendrait alors comme une simple seringue souillée transportant l'agent pathogène d'un hôte à l'autre. On comprend alors qu'une simple piqure utilisant la même aiguille permettrait la transmission du parasite d'un bovin à un autre. Moyen simple de prophylaxie qui dépasse le cadre de cette

étude sur la besnoitiose, il est donc primordial d'utiliser des aiguilles à usage unique dans des troupeaux reconnus infectés.

2. Autres modes de transmission non clarifiés

a. Contamination par voie orale et par contact direct

Actuellement, la voie de contamination orale semble minoritaire si elle se produit avec l'ingestion d'oocystes sporulés d'origine digestive émis par un hôte définitif non encore découvert. Cependant, lors de formes chroniques, les kystes à bradyzoïtes présents au niveau des naseaux, du mufle, des orbites laissent envisager une auto-contamination, par léchage entre bovins (si toutefois, les zones léchées étaient légèrement lésées). Si les microlésions sont présentes au niveau de la muqueuse nasale, on pourrait avoir contamination après simple flairage entre bovins. Enfin, on peut retrouver de nombreux kystes au niveau de la mamelle et particulièrement dans les acini, la rupture de ces kystes au moment de la tétée par le veau serait alors possible (Bigalke, 1968 ; Alzieu, 2007b).

b. Transmission par contact indirect

① Via les arthropodes non piqueurs

Cortes et son équipe (2005) ont réussi à isoler des tachyzoïtes au niveau des sécrétions lacrymales, ce qui laisse envisager que certaines espèces de mouches lécheuses telles que *Musca automnalis* et *Musca domestica*, puissent transmettre le parasite à des bovins sains.

② Via les manchons trayeurs

Dans l'hypothèse où les vaches présenteraient des microlésions au niveau des trayons avec libération de parasites, on pourrait supposer une transmission par l'intermédiaire des manchons trayeurs lors de la traite. Ce qui pourrait concorder avec l'allure épizootique observée dans les troupeaux laitiers (Alzieu et al., 2007a).

c. Transmission par voie verticale

La transmission « de vache à veau » est peu probable car de nombreuses observations convergentes au Portugal, en Allemagne et en France ont montré que les veaux nés de vaches infectées, ayant présenté des signes cliniques ou non, ont des anticorps d'origine colostrale pendant 5 à 6 mois puis redeviennent complètement séronégatifs (Liénard et al., 2011).

IV. ETUDE CLINIQUE

A. Pathogénie

La lésion pathognomonique de la besnoitiose bovine est le kystes à bradyzoïtes (Franc et al., 1987).

Environ quatre jours après inoculation du parasite, une inflammation périvasculaire s'installe. Une semaine post-infection, les tachyzoïtes se multiplient dans les cellules endothéliales des veines du tissu conjonctif sous-cutané, remontant ainsi jusqu'aux vaisseaux d'un diamètre de 4 mm. Cette invasion provoque petit à petit l'épaississement de l'endothélium vasculaire, et la formation de thrombi empêchant une bonne circulation sanguine. Il s'en suit un infarcissement des territoires en aval, et l'apparition d'œdèmes. Les lésions de thrombophlébite génèrent une nécrose vasculaire, à l'origine de foyers hémorragiques (Franc et al., 1987).

L'intense réaction inflammatoire périvasculaire et la parasitémie sont responsables du syndrome fébrile initial. Des granulocytes éosinophiles, ainsi que des histiocytes affluent en très grand nombre sur les sites inflammatoires, ce qui se traduit par la formation des kystes. Ces kystes se localisent préférentiellement au niveau de la peau, des muqueuses des voies aériennes supérieures, de la conjonctive (Ferrié, 1984). Les kystes deviennent mâtures de 30 à 70 jours post-infection, et se stabilisent vers le 75^{ième} jour.

B. Immunité (Alzieu et al., 2011)

Le pouvoir immunogène de *Besnoitia besnoiti* est encore très mal connu. Seules quelques données scientifiques provenant d'expérimentations réalisées sur rongeurs prouvent l'existence et l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Celle-ci dépend en partie de l'activation des macrophages à partir de l'interféron gamma. Cependant, les kystes permettent au parasite d'échapper au système immunitaire. Leur devenir est variable : soit les parasites survivent dans les kystes durant plusieurs années, soit les parasites se multiplient à la suite d'une réactivation. Celle-ci peut survenir suite à une baisse de l'immunité ou suite à une maladie intercurrente. Par contre, l'élimination totale des kystes est peu probable.

C. Symptomatologie

Il est observé que seule une petite proportion des animaux infectés développe tout le cortège des symptômes. La plupart des sujets contaminés (>80%) deviennent porteurs latents asymptomatiques. Les raisons de cette variation individuelle ne sont pas encore connues mais pourraient être dues à une combinaison de différents facteurs : sensibilité individuelle (fond génétique notamment), différences de virulence parmi les souches parasitaires, inégale transmission parasitaire selon les vecteurs, exposition répétée ou simple, caractères immunosuppresseurs de la salive des vecteurs, stade parasitaire (tachyzoïte ou bradyzoïte).

Les animaux atteints développent dans un délai variable (de deux semaines jusqu'à plusieurs mois) un tableau clinique et lésionnel, typique et inchangé, d'intensité croissante au cours du temps (Alzieu et al., 2007a et 2011 ; Franc et al., 1999 ; Jacquiet et al., 2010).

Une courte période d'incubation (6 à 10 jours) précède trois phases cliniques successives :

① Phase aiguë et fébrile

Le syndrome fébrile, qui dure de 3 à 10 jours, est caractérisé par une hyperthermie marquée (fréquemment entre 41 et 42°C) et un abattement. Il est associé à une parasitémie importante et à une intense multiplication des tachyzoïtes dans les macrophages, les fibroblastes et dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Le bovin est ensuite atteint d'un cortège de symptômes décrits dans le tableau 2.

Appareil	Symptômes
Peau et muqueuses	congestion, échauffement, douleur, hyperesthésie
Poils*	hérissement
Oculaire	photophobie, épiphora constant et abondant
Naso-pharyngé	jetage séreux filant
Cardio-respiratoire	tachycardie, tachypnée, dyspnée
Digestif	arumination, anorexie
Génital	avortement (rare)
Locomoteur	piétinement, répugne à se déplacer et à se coucher

*encolure, face interne des cuisses, région périnéale, oreilles, chanfrein.

Tableau 2 : Classification des symptômes au stade fébrile de la maladie en fonction de l'appareil atteint (Alzieu et al., 2011 ; Franc et al., 1987).

Photos : (14) Phase fébrile : épiphora, photophobie et jetage séreux (JP Alzieu) ; (15) Phase fébrile : jetage séreux filant (JP Alzieu)

② Phase des œdèmes

Cette seconde phase apparaît à la suite de la phase fébrile, et correspond à une forme subaiguë de la maladie. Elle dure 1 à 2 semaines et se caractérise par une diminution de la température rectale, simulant une guérison avec atténuation des signes généraux.

D'un point de vue clinique, on observe :

- un animal douloureux à la palpation, sa peau reste chaude et épaisse (sans sclérodermie), et perd de son élasticité (en particulier au niveau de l'encolure et de la région thoracique).

- un animal réticent à se déplacer et anorexique, avec apparition de nombreux œdèmes sous-cutanés au niveau de la face, du fanon, et des régions déclives, en particulier des membres, des boulets parfois jusqu'aux canons. Les articulations sont douloureuses et les nœuds lymphatiques superficiels sont hypertrophiés.

- une vache présentant une mamelle congestionnée, douloureuse, et violacée à la base des trayons. La production laitière est en forte diminution.

- un taureau présentant de sévères orchites accompagnées de testicules douloureux à la palpation, et d'une infertilité transitoire ou définitive (Cortes et al., 2005).

Des cas d'avortements et de diarrhée ont été décrits (Ferrié, 1984).

Photos : (16) Phase des œdèmes : œdèmes déclives sur les membres (plis d'œdèmes, gonflement des boulets). (JP Alzieu) ; (17) Phase des œdèmes : plissements et hyperkératose au niveau des bourses testiculaires (Pathologie des Ruminants ENVT) ; (18) Phase d'œdèmes : zones violacées à la base des trayons (JP Alzieu)

Photo 19 : Fin de la phase des œdèmes : complications de crevasses avec exsudats séro-hémorragiques à l'extrémité des membres (JP Alzieu / P Jacquiet)

③ Phase de sclérodermie

La phase chronique qui s'en suit démarre donc environ 6 semaines après le début des symptômes et peut durer plusieurs mois. Elle est caractérisée par la régression des œdèmes et la formation de nombreux kystes à bradyzoïtes. Ces kystes sont retrouvés dans la peau, le tractus respiratoire haut, le tissu conjonctif, la sclère conjonctivale, les muscles, la muqueuse vaginale et parfois dans la rate, le foie, et le muscle cardiaque. La peau s'épaissie fortement (phase de sclérodermie), se plisse et présente des zones d'alopécie liées à l'écrasement du follicule pileux par les kystes, évoquant la peau d'un éléphant (hyperkératose). On retrouve ces zones au niveau de l'encolure, des faces latérales de la tête, de la face interne des cuisses, du scrotum et de la mamelle. Au niveau de l'extrémité des membres et des articulations du carpe, du boulet et du jarret, on peut retrouver des crevasses et/ou des escarres, surinfectées ou non. Chez la vache, la mamelle est déformée, du fait d'excroissances ou d'hypertrophie des trayons, rendant la traite/tétée difficile. Au niveau locomoteur, la démarche est de plus en plus raide, les déplacements de plus en plus difficiles. Les bovins qui arrivent jusqu'à ce stade de la maladie dépérissent petit à petit. Ils sont alors envoyés à l'abattoir ou bien euthanasiés, dans les deux cas, dans un souci de bien-être animal et parce qu'ils deviennent des non-valeurs économiques. Malgré tout, certains animaux survivent dans cet état, et dans de rares cas, on peut assister à la régression partielle, voire totale des symptômes cutanés en 3-4 mois (Jacquiet et al., 2010 ; Alzieu et al., 2011).

Seulement 25% des animaux infectés présentent au bout de la 6ième ou 7ième semaine après la phase fébrile des kystes oculaires pathognomoniques de la besnoitiose. Ils sont de la taille d'une tête d'épingle et on peut les repérer le plus simplement au niveau du limbe scléro-cornéen. Les kystes peuvent être également observés sur la muqueuse vaginale. Dans les deux cas, le repérage de ces kystes comme unique méthode diagnostique n'est plus concevable car elle manque de sensibilité.

Photos :
(20) Phase de sclérodermie : hyperkératose et plis cutanés à la phase interne des cuisses (JP Alzieu)
(21) Phase de sclérodermie : plis d'hyperkératose sur les membres et dépilations diffuses (JP Alzieu)
(22) Phase de sclérodermie : déformation intense des trayons et hyperkératose tégumentaire (P Jacquiet)

Photos : (23) Phase terminale : émaciation, hyperkératose, déformations articulaires, mélanose des muqueuses et de leur pourtour (JP Alzieu)
(24) Phase terminale : hyperkératose, déformations articulaires (P Jacquiet)

Photos : (25) Phase terminale : hyperkératose, dépilation, éléphantiasis (P Jacquiet)
(26) Phase terminale : hyperkératose et mélanose du pourtour du mufle (JP Alzieu)
(27) Phase de sclérodermie : kystes sur le limbe scléro-cornéen et la conjonctive.
Hyperkératose cutanée périoculaire avec formation de plis et dépilations (JP Alzieu)

Photo 28 : Phase de sclérodermie : kystes sur le limbe scléro-cornéen et la conjontive palpébrale (P Jacquiet)

D. Lésions macroscopiques (Franc et al., 1987 ; Legrand, 2003)

Durant les 2 premières phases de la maladie, les lésions à dominante congestivo-hémorragique évoquent un tableau septicémique. Ce n'est qu'à la troisième et dernière phase que l'on voit apparaître les lésions les plus caractéristiques, pathognomoniques de la besnoitiose, à savoir la présence de nombreux kystes à bradyzoïtes, visibles à l'œil nu dans différents tissus de l'organisme du bovin.

Le tableau 3 ci-dessous présente les principales lésions observables même si elles ne sont pas toujours présentes.

	Phase fébrile et d'œdèmes	**Phase de sclérodermie**
Carcasse	congestion généralisée.	hydrocachexie, kystes.
Peau*	congestion.	hyperkératose, dépilation, kystes.
Tissu sous-cutané	œdèmes des parties déclives.	kystes.
Muscles, fascias, tendons	foyers de dégénérescence.	marbrures blanchâtres, kystes.
Articulations	boulets : arthrite séro-fibrineuse, pétéchies.	capsules articulaires : kystes.
Os	aucune lésion macroscopique.	périoste des os distaux : kystes.
Système lymphatique	nœuds : hypertrophie modérée.	nœuds périphériques : hypertrophie modérée.
Cavité abdominale	péritonite fibrineuse.	péritonite fibreuse.
Cavité thoracique	pleurésie fibrineuse.	pleurésie fibreuse.
Système digestif	congestion. muqueuse : pétéchies.	absence de lésion macroscopique.
Foie	foyers de dégénérescence. aspect marbré.	kystes.
Vésicule biliaire	pétéchies.	absence de lésion macroscopique.
Rate	légère splénomégalie.	kystes.
Reins	pétéchies.	kystes.
Appareil génital	utérus : pétéchies.	orchite bilatérale. épididymite bilatérale. vagin : muqueuse : kystes.

		endomètre : kystes.
Appareil cardio-vasculaire	endocarde : pétéchies.	veines** : intima : kystes. cœur droit : endocarde : kystes.
Appareil respiratoire	poumons et trachée : congestion. larynx, pharynx : pétéchies.	muqueuses*** : kystes. parenchyme pulmonaire : kystes.

* régions préférentielles : partie inférieure des membres, tête, encolure, épaules, volets costaux, croupe et région périnéale.

** en particulier de l'extrémité des membres (veines saphènes), de la tête, de la queue, ainsi que les jugulaires.

*** pituitaire, conjonctivale, sinusale, du pharynx, de la trachée, des bronches

Tableau 3 : Ensemble des lésions macroscopiques observables lors des différentes phases de la besnoitiose.

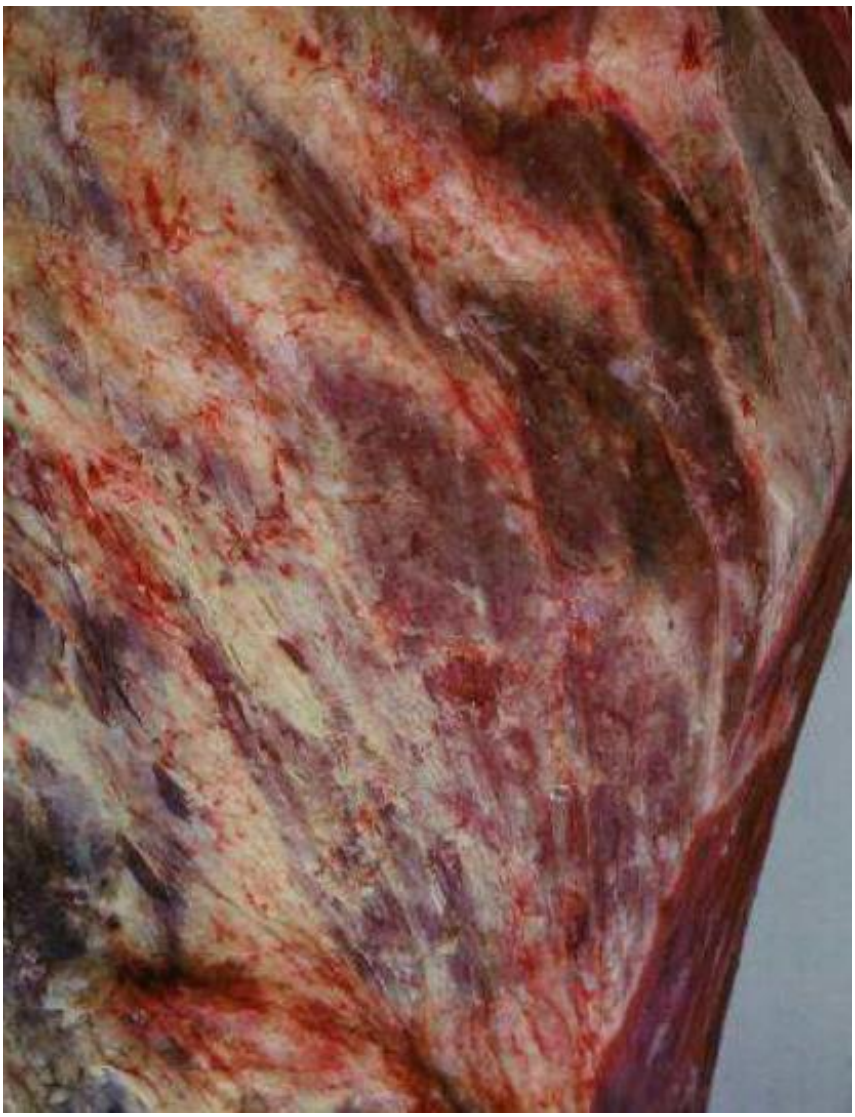
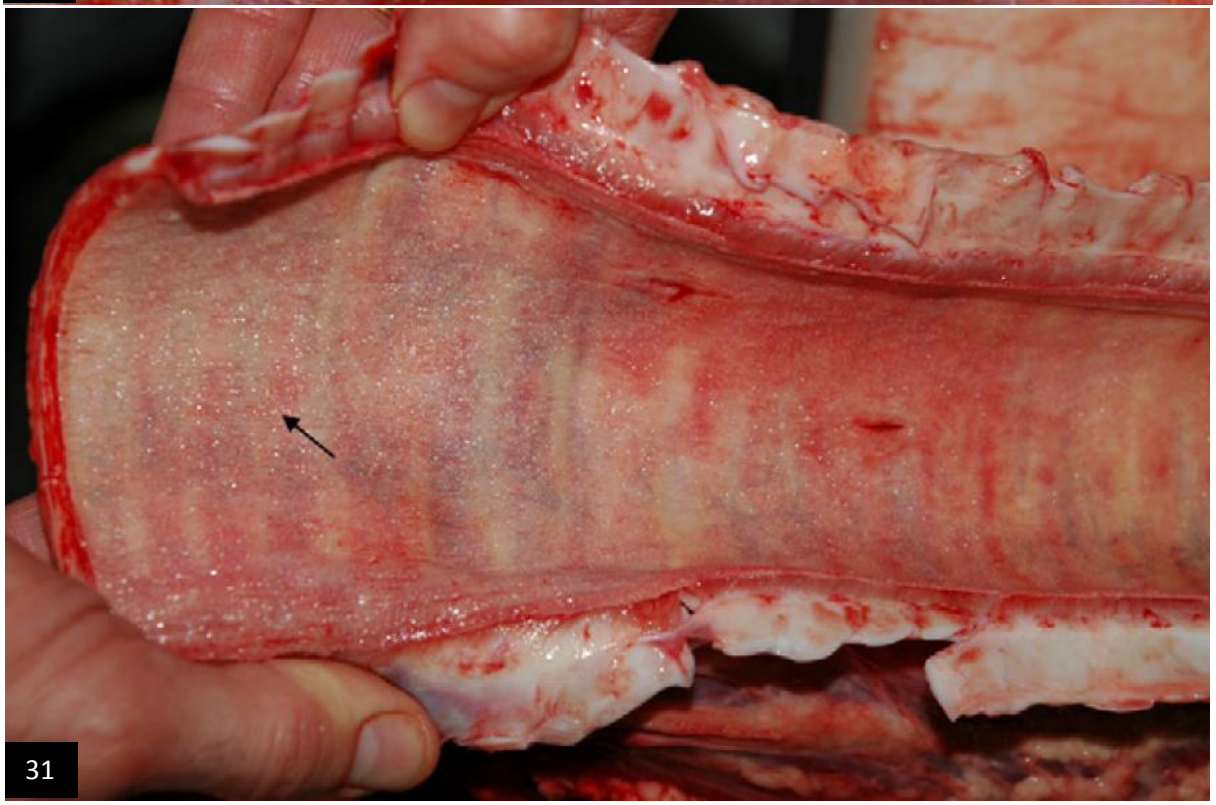


Photo 29 : Phase fébrile : aspect congestivo-hémorragique de la carcasse (JP Alzieu)



Photos : (30) Phase de sclérodermie : nombreux kystes à bradyzoïtes dans le tissu conjonctif sous-cutané (JP Alzieu)

(31) Phase de sclérodermie : kystes à bradyzoïtes dans la muqueuse trachéale d'une vache infectée chroniquement (JP Alzieu)

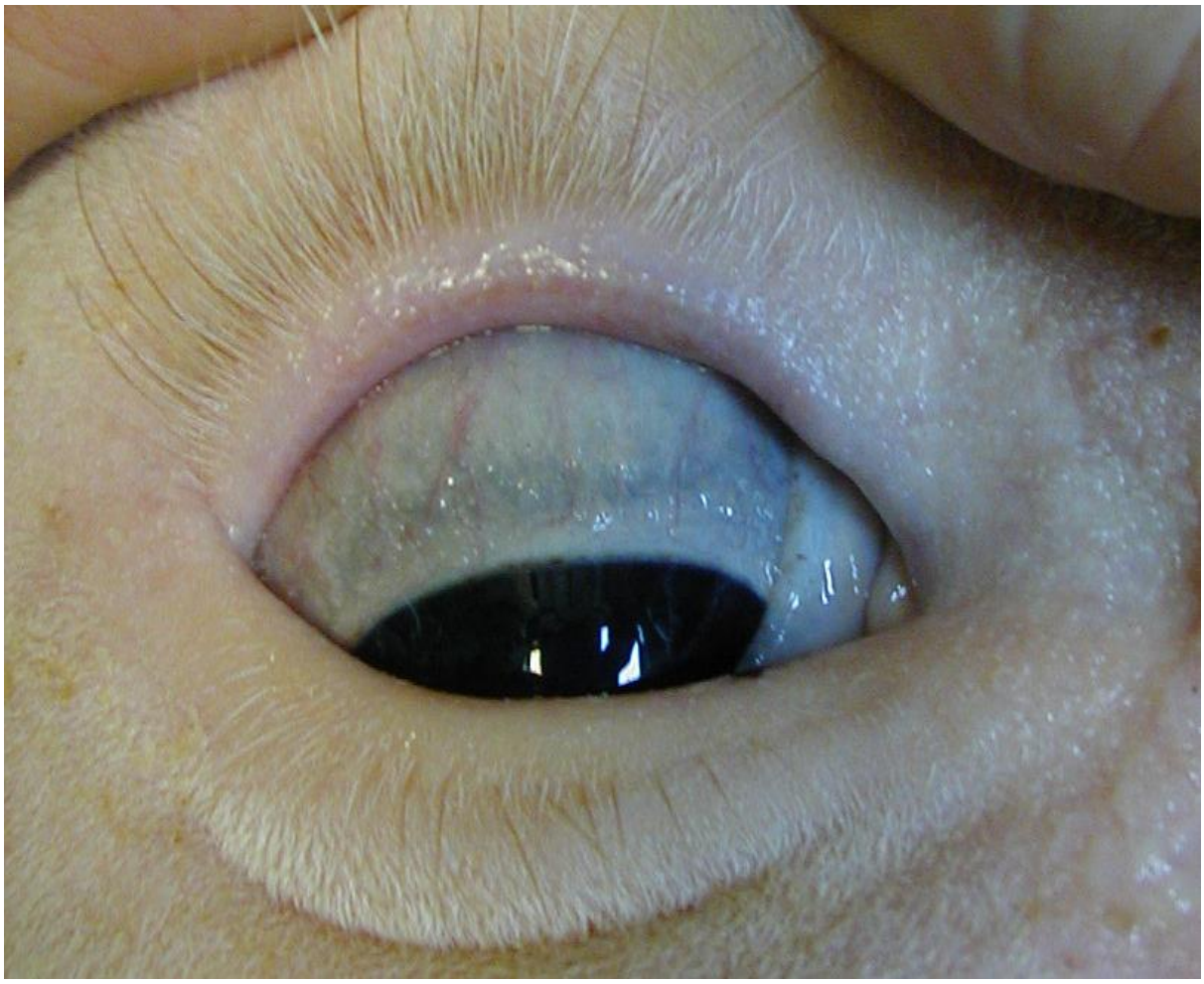


Photo 32 : Phase de sclérodermie : kystes à bradyzoïtes de la taille d'une tête d'épingle sur la sclérotique (Pathologie des Ruminants ENVT)

E. Lésions microscopiques (Franc et al., 1987 ; Legrand, 2003)

1. Phase fébrile et d'œdèmes

Les lésions des deux premières phases de la maladie sont pour la plupart de type vasculaire. Elles touchent les petites veines, puis les plus grandes (jusqu'à un diamètre de 4 mm). Les tachyzoïtes sont à l'origine des lésions. On retrouve les tachyzoïtes dans les histiocytes périvasculaires, créant une inflammation à éosinophiles et à cellules mononuclées. Puis, les parasites colonisent l'endothélium vasculaire, ce qui est l'origine de son épaississement et de celui du tissu conjonctif adjacent. On a donc formation de thrombi qui se nécrosent. Secondairement, on observe des lésions de thrombophlébite qui augmentent le risque de thrombo-embolie et d'hémorragie. On peut retrouver ce type de lésions dans tout l'organisme du bovin, mais préférentiellement au niveau de la peau, des muqueuses vaginales, des voies aériennes supérieures et de la conjonctive.

En ce qui concerne l'appareil locomoteur, on peut observer des lésions musculaires dégénératives, de type nécrose-dégénérescence cireuse de Zenker, avec parfois, des zones de minéralisation.

Enfin, le parenchyme hépatique peut présenter des foyers de dégénérescence hyaline des hépatocytes, avec vacuolisation des cellules.

2. Phase de sclérodermie

Les lésions microscopiques sont décrites pour certains tissus seulement :

	Phase de sclérodermie
Œil	sclère conjonctivale, iris : nombreux kystes. corps ciliaires : rares kystes. cornée avasculaire, choroïde, rétine : absence de kystes.
Peau*	épiderme : jamais de kystes. derme : stratum papillosum : kystes et zones fibreuse autour.
Tissu sous-cutané	kystes.
Muscles, fascias, tendons	nombreux kystes. dégénérescence cireuse : 1ière couche : cellules granulomateuse ; 2ième couche : cellules en fuseau ; 3ième couche : zone nécrotique.
Système lymphatique	nœuds lymphatiques : hyperplasie lymphoïde, kystes sous la capsule.

Appareil génital	testicules : calcifications focales ou multiples, de taille et d'opacité variables (Giancamillo et coll), lésions vasculaires ; tubes séminifères : zones de nécrose de coagulation : réaction interstitielle lymphocytaire. vagin : muqueuse : kystes. endomètre : kystes. parois des veines : kystes. utérus : granulome parasitaire autour des kystes.
Appareil cardio-vasculaire	parois des vaisseaux : intima, média, adventice : kystes, souvent protubérants dans la lumière vaisseaux.
Appareil respiratoire	faisceaux musculaires du pourtour des narines : kystes. mufle : stratum papillosum : glandes sudoripares : kystes adhérents. septum nasal et éthmoïde : muqueuse : kystes. larynx, trachée : épithélium : kystes.

Tableau 4: Ensemble des lésions microscopiques observables lors de la phase de sclérodermie de la besnoitiose.

V. DIAGNOSTIC

A. Épidémio-clinique

La connaissance du tableau clinique de la maladie est essentielle pour un diagnostic efficace et le plus précoce possible. Il s'agit de la connaissance des symptômes, ainsi que des lésions macroscopiques associées. L'évolution en trois phases distinctes et pathognomonique pour la dernière en fait un atout supplémentaire pour une meilleure détection clinique. Le syndrome fébrile initial n'est pas spécifique à cette maladie, ce qui en fait une phase difficile à diagnostiquer. A l'apparition des œdèmes, le diagnostic est alors sans équivoque. Lors de la dernière phase, la clinique est univoque et permet un diagnostic de quasi-certitude. En ce qui concerne les animaux infectés latents, leur dépistage est capital et repose sur la détection des kystes à bradyzoïtes présents au niveau de la sclérotique. Il s'agit d'un diagnostic clinique fiable et spécifique (Franc et al., 1987). Malheureusement, si l'on s'appuie uniquement sur la clinique, le diagnostic est souvent tardif. L'épidémiologie de base est à connaître pour améliorer le diagnostic. Une suspicion précoce repose sur un contexte épidémiologique basé sur : l'âge des animaux, le mode d'élevage, la saison (Ferrié, 1984). La localisation géographique est quant à elle à interpréter de manière prudente car le nombre de foyers augmente en France et on retrouve des cas sporadiques de plus en plus loin de la région endémique historique (Alzieu et al., 2007).

B. Différentiel

1. Pendant la phase fébrile (Franc et al., 1987 ; Fonclara, 2011)

Le syndrome fébrile initial peu spécifique peut être retrouvé lors de bronchopneumonies, de coryza gangréneux, ou lors de fièvre catarrhale ovine :

- Les bronchopneumonies infectieuses enzootiques (BPIE), se manifestent, en plus du syndrome fébrile, par un jetage bilatéral, une anorexie, une arumination. La différence se fait donc au niveau pulmonaire où l'auscultation est d'une grande importance.

- Le coryza gangréneux ou maladie des trois fontaines, entraine comme son nom l'indique du jetage, du ptyalisme et un larmoiement. Elle se retrouve plutôt dans les élevages mixtes bovin / ovin puisqu'il s'agit d'un herpès virus ovin qui contamine les bovins. A la différence de la besnoitiose, on a une kératite bleue bilatérale et une poly-adénomégalie.

2. Pendant la phase des œdèmes (Alzieu et al., 2007b)

- L'ehrlichiose à *Anaplasma phagocytophilum* est à différencier de la besnoitiose par ses œdèmes de l'extrémité des membres, ou des parties déclives en général.

- La fièvre catarrhale ovine (forme sub-aiguë) est, quant à elle, à différencier de la besnoitiose par ses ulcères au niveau de la muqueuse buccale, et par son absence de modification du revêtement de la peau (malgré une hyperesthésie cutanée).

- Des œdèmes d'origine cardiaque sont situés préférentiellement au niveau de l'auge (signe de la bouteille) et/ou du fanon. On peut également observer une distension des veines jugulaires et plus rarement une distension abdominale (ascite).

Une attention toute particulière est à privilégier par rapport à l'évolution et à la localisation précise des œdèmes, ainsi que des modifications cutanées.

3. Pendant la phase de sclérodermie et de dépilations (Franc et al., 1987 ; Legrand, 2003)

- Les gales, qu'elles soient sarcoptique, chorioptique ou psoroptique, sont des parasitoses externes extrêmement prurigineuses et entrainant une hyperkératinisation de la peau. Par contre, elles n'entrainent ni fièvre, ni œdèmes.

- Les phtirioses sont caractérisées par un prurit important responsable de dépilations, de croûtes, et d'épaississement cutané, autour des yeux, sur l'encolure et sous la queue. On les différencie grâce à leur caractère saisonnier, frappant surtout l'hiver ; et aussi par son absence de répercussion sur l'état général de l'animal et par l'observation macroscopique des parasites dans le pelage.

- La dermatophilose à *Dermatophilus congolensis*, est peu contagieuse, et touche aussi bien les petits ruminants que les chevaux, de préférence lorsqu'il fait chaud et humide. D'un point de vue lésionnel, on observe des petits nodules fermes et secs dans les zones où la peau est épaissie et rugueuse, notamment sur la croupe, le dos, l'encolure, le garrot, les côtes et parfois la tête. Concomitamment, on observe un hérissement de quelques touffes de poils. A la suite de ces lésions, on observe l'apparition de zones alopéciques et de parakératose, associées à une adénopathie.

- La photosensibilisation se manifeste par l'apparition de lésions congestives, érythémateuses, et extrêmement prurigineuses, au niveau des zones dépigmentées et/ou dépilées (mufle, paupières, mamelle, vulve, scrotum, oreilles, ligne du dos, bourrelet coronaire des onglons, face interne des cuisses). D'autres symptômes sont associés : jetage, larmoiement, photophobie. Il s'en suit la formation d'œdèmes, puis de zones alopéciques où la peau se fissure, se détache et se gangrène (Gourreau, 2000).

- La démodécie donne des lésions la plupart du temps discrètes représentées par quelques petits nodules dans les follicules pileux de l'encolure et du garrot.

- Les parakératoses se caractérisent par des plaques dures, épaisses et douloureuses à la base des cornes, sur le mufle, au niveau des articulations des membres et dans les régions vulvaire et péri-anale. Elles sont soit primaires, soit secondaires à une carence en zinc, et affecte généralement l'état général.

- L'ichtyose congénitale se définit par la présence de lésions de type hyperkératose puis exfoliation au niveau du revêtement cutané du dos, du garrot, des faces latérales de l'encolure et du mufle. Les lésions laissent apparaître des zones alopéciques, qui se fissurent puis s'ulcèrent. Par contre, aucun nodule n'est détectable, et une hyperthermie n'est décelable que lors de surinfections bactériennes.

- Le syndrome de dermatite prurigineuse de la vache laitière est caractérisé par des lésions d'hyperkératose, une hyperthermie, et des hémorragies internes diffuses. Il s'agit d'une intoxication alimentaire au formol et à l'acide sulfurique, tout deux contenus dans l'ensilage de maïs.

- Les intoxications aux légumineuses (trèfle, vesce, lupin) se retrouvent surtout en mai-juin, et donnent une dermite papuleuse au niveau de la tête, du cou, de la mamelle, des trayons, du scrotum, du périnée. Des symptômes affectant la face sont associés : conjonctivite, congestion et œdème des paupières, jetage, ptyalisme. Une diarrhée sévère peut dégrader l'état général de l'animal.

- La dermatite nodulaire, d'origine virale, se caractérise par de volumineux nodules cutanés localisés au niveau de l'encolure et des flancs. On trouve également associés une polyadénomégalie superficielle et des œdèmes des membres. On ne la retrouve pas en France.

C. Expérimental

Le diagnostic expérimental de certitude est primordial dans les deux premières phases de la maladie, la troisième phase possédant un tableau clinique déjà très évocateur. Pour cela, plusieurs méthodes sont disponibles : celles qui permettent la mise en évidence du parasite ou de son ADN, et celles permettant la mise en évidence de la réaction immunitaire.

1. Méthodes dites « directes » : mise en évidence du parasite

a. Histologie

Les kystes à bradyzoïtes sont facilement observables au niveau de la sclère ou de la muqueuse vulvaire chez une petite proportion d'animaux infectés (moins de 1 sur 4) car la grande majorité est représentée par les bovins infectés asymptomatiques (Alzieu et al., 2009 ; Jacquiet et al., 2010 ; Liénard et al., 2011).

Une biopsie réalisée sous anesthésie locale sur un lambeau de peau « cartonné » permet la mise en évidence de kystes à bradyzoïtes après analyse histologique. Cependant, cet

examen ne permet la détection des kystes que 5 à 6 semaines après le début de la phase fébrile.

Le simple grattage du derme ou le raclage scléral, suivi de l'écrasement du prélèvement entre lame et lamelle permet un diagnostic de certitude après révélation de la structure caractéristique des kystes à bradyzoïtes de *Besnoitia* (Alzieu et et al., 2011 ; Jacquiet et al., 2010). Cette technique ne demande pas de coloration, elle est rapide et peu coûteuse (Franc et al., 1987).

b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Avant 2007, la détection du parasite était exclusivement basée sur la visualisation des kystes à bradyzoïtes et sur l'histopathologie (Cortes et al., 2007a). Depuis les travaux de Cortes et al. (2007a), il a été montré que le segment ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) était un marqueur spécifique de l'espèce *Besnoitia besnoiti*, ainsi que de la sous-famille des Toxoplasmatinae (Tenter et al., 2002). Ils ont mis au point deux tests : une PCR conventionnelle, ainsi qu'une PCR en temps réel (RT-PCR). Tous deux spécifiques et sensibles, basés sur l'amplification de séquences d'ADNr spécifiques du parasite, permettant la détection de *B. besnoiti* dans les biopsies de peau de bovin.

Dans le but de déterminer la sensibilité de la PCR conventionnelle et de la RT-PCR, des mesures ont été réalisées avec des quantités variables de bradyzoïtes (10 000, 1 000, 100, 10, et 1) (figure 13). La sensibilité des réactions d'amplification est très élevée car elle a permis la détection d'un seul parasite dans une biopsie cutanée de 200 µg (Fonclara, 2011).

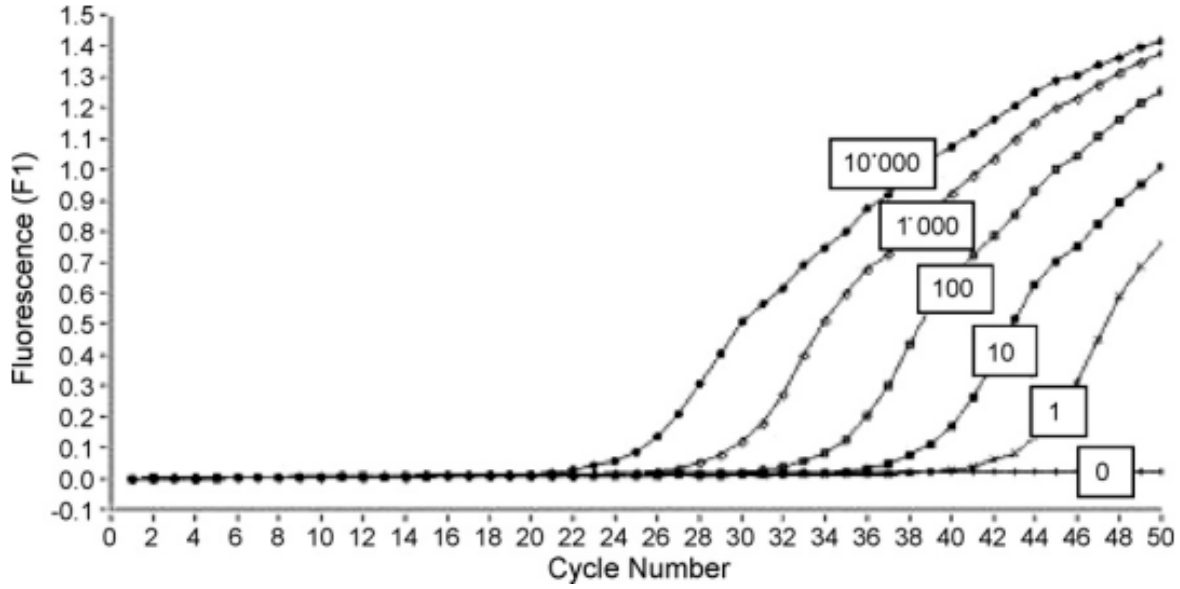


Figure 13 : Sensibilité de la PCR en temps réel d'ITS1 ADNr (Cortes et al., 2007a)

La RT-PCR est une amélioration utile par rapport aux autres procédures disponibles, car elle permet la détection de *B. besnoiti* même dans les échantillons de peau qui ont été recueillis à partir d'animaux séropositifs mais asymptomatiques. Avec une approche quantitative, la RT-PCR est un outil utilisé essentiellement pour des études épidémiologiques.

Une piste actuellement explorée est le développement d'une PCR quantitative permettant le dépistage de tachyzoïtes dans le sang. La mise au point de cette technique permettra de poser un diagnostic précoce, dès les premiers signes cliniques, à un moment où toute autre technique usuelle ne peut actuellement déceler une concentration encore insuffisante en anticorps. Cela permettra de mettre en place une démarche thérapeutique encore plus tôt.

c. Immunofluorescence directe

A la différence de l'immunofluorescence indirecte (IFI), cette technique consiste à mettre en évidence le parasite dans le sang et non la présence d'anticorps anti-*B. besnoiti*. Elle a été développée par Liénard et al. (2012) mais n'est pour le moment pas utilisée en routine car il faut se trouver durant la phase fébrile ou des œdèmes de la maladie. D'un point de vue technique, le principe est quasiment le même que pour l'IFI, il consiste à extraire le parasite du sang du bovin contaminé, et de le fixer sur lame après hémolyse, et le mettre en contact avec du sérum de bovin contenant des anticorps anti-*B. besnoiti*. La présence d'un agent fluorescent permet la visualisation du parasite sous microscope au grossissement x400.

2. Méthodes dites « indirectes » : sérologie

L'identification sérologique des bovins infectés asymptomatiques est importante pour empêcher l'introduction de bovins infectés dans des troupeaux n'ayant jamais rencontré le pathogène.

a. Immunofluorescence indirecte (IFI)

L'immunofluorescence indirecte repose sur une réaction spécifique entre l'antigène et l'anticorps recherché anti-*B. besnoiti*. Un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire, révèle le complexe antigène-anticorps. On mesure la fluorescence au microscope à ultraviolets, à la dilution 1:200^{ième}. Une lame est positive si on observe une fluorescence sur tout le contour des tachyzoïtes.

L'IFI permet la détection des anticorps anti-*B. besnoiti* dès 10 jours après une injection intraveineuse, et dès 22 jours après une injection sous-cutanée de parasites. Cette différence peut probablement être due à la différence de voie d'administration, de la dose et de la souche (Janitschke et al., 1984).

En 2002, les travaux de Shkap ont montré qu'il n'existait pas de protection croisée entre *B. besnoiti* et *N. caninum*. En revanche il a montré qu'il existait des réactions croisées avec les anticorps anti-*N. caninum* lorsque le seuil de dilution pour la lecture était fixé en-dessous de 1:200. Les récents travaux de Schares (2010) ont également mis en évidence des réactions croisées entre les anticorps de *N. caninum* et les antigènes de *B. besnoiti*. De possibles réactions croisées ont été mises en évidence avec les anticorps anti-*T. gondii* (Goldman et Pipano, 1983).

Schares et son équipe (2010) ont montré qu'au seuil de dilution 1:100, la sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 97 et 98%, et qu'au seuil de dilution 1:200, elles étaient respectivement de 92 et 100%.

En 2012, Garcia-Lunar et al., au sein d'un consortium européen, ont réalisé une étude comparative des différentes techniques sérologiques utilisées pour le diagnostic de la besnoitiose à *B. besnoiti*. Deux différentes méthodes d'IFI ont été comparées : la méthode allemande a donné de meilleurs résultats que la méthode espagnole avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 95,4% (seuil fixé à 1:200). Les différences peuvent être attribuées à la qualité des réactifs employés et de la valeur du seuil décisionnel utilisé.

C'est une technique de diagnostic individuel car elle est assez lourde à mettre en place et plus coûteuse que l'ELISA. En effet, au laboratoire de Parasitologie de l'ENV-Toulouse, un test ELISA est estimé à 10 euros TTC, contre 15 euros TTC pour l'IFI. Par rapport au Western Blot (WB), selon Schares (2010), l'immunofluorescence indirecte pourrait être plus sensible. Il serait intéressant de mettre en place cette technique de diagnostic afin d'arbitrer le statut d'un bovin lors de résultats discordants entre l'ELISA et le WB.

b. Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay (ELISA)

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique qui permet la détection des anticorps anti-*B .besnoiti* dans un échantillon de sérum. La réaction fait appel aux anticorps spécifiques de l'antigène (ceux recherchés) et à des anticorps couplés à une enzyme, spécifiques du complexe immun formé. La réaction enzymatique produite créée une coloration quantifiable par spectrophotométrie.

La technique décrite par Cortes (2006a) a été adaptée de celle mise au point par Gottstein (1999) pour la Néosporose à *N. caninum*. Elle possède une bonne sensibilité (87%), quelque soit le stade clinique de l'animal testé, et une très bonne spécificité (97,5%). Malgré tout, la sensibilité n'est pas aussi bonne que pour l'IFI ou le WB. Aucune réaction croisée n'a été observé avec *N. caninum* et peu avec *T. gondii* (Cortes et al., 2006a). Elle a les avantages de ne demander que peu de réactifs, d'être peu coûteuse, et de pouvoir tester des centaines de sérums en une journée (Janitschke et al., 1984). L'ELISA est recommandée en tant que test de dépistage de masse de la besnoitiose, par exemple pour connaître la prévalence dans un troupeau ou une région. Par contre, du fait de sa très faible valeur prédictive positive, il est important de confirmer les cas positifs par une autre technique telle que le WB (Cortes et al., 2006a).

Plusieurs tests ELISA sont actuellement commercialisés en Europe (PrioCheck® Besnoitia Ab. V2.0, ID Screen® Besnoitia indirect, INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA). Le test PrioCHECK® Besnoitia Ab V2.0 (annexe 4) est une version améliorée. Sa version originale (annexe 3) a fait l'objet d'une évaluation en 2010 par l'équipe de Schares, donnant une sensibilité de 75,5% et une spécificité de 96,8%. Leurs travaux ont clairement montré que les animaux dont les résultats sont « non interprétables » par le PrioCHECK ® Besnoitia Ab (*i.e.* animaux avec des valeurs entre 10 et 20%) devraient être considérés comme infectés. En considérant un seuil décisionnel à 10%, la spécificité du diagnostic a été calculée en dessous de 95%, donc les résultats positifs obtenus avec le PrioCHECK ® Besnoitia Ab doivent être confirmés par d'autres tests sérologiques. A ce même seuil de positivité de 10%, la sensibilité a été grandement améliorée (91,8%). L'abaissement du seuil décisionnel en dessous de 10% ne permettrait pas d'obtenir des résultats satisfaisants puisque le nombre de faux positifs augmenterait de façon spectaculaire. A la différence des observations faites par Cortes et al. (2006a), il a été observé durant cette évaluation des réactions croisées avec *N. caninum*.

Des retours de terrain sur l'utilisation du test PrioCHECK® Besnoitia Ab ont permis de mettre en évidence plusieurs points intéressants :

① il existe souvent une faible proportion d'animaux dont les résultats sont proches du seuil de positivité. Il s'agit sans doute des quelques réactions croisées avec *N. caninum*. Ces animaux sont à tester de nouveau avec un WB (Alzieu et al., 2011).

② la présence de kystes à bradyzoïtes dans la peau ou la sclère assure une stimulation antigénique permanente génératrice d'une réponse anticorps entretenue et importante (Liénard et al., 2011 ; Schares et al., 2011). Si le rapport entre la réponse anticorps mesurée par ELISA et la richesse en kystes de la peau est proportionnel, cela nous donne donc un aperçu de la capacité d'un bovin à transférer le parasite à un animal sain. L'élimination sélective de ces bovins possédant des concentrations élevés en anticorps pourrait diminuer la pression de transmission de la besnoitiose dans un troupeau infecté (Alzieu et al., 2011).

③ un résultat positif n'a pas été observé avant 3 semaines après le début des signes cliniques.

D'après Garcia-Lunar et al. (2012), les deux meilleurs tests ELISA actuellement commercialisés en Europe sont les tests ID Screen Besnoitia indirect IDVET et PrioCHECK Besnoitia Ab V2.0, avec respectivement 97,2% et 100% de sensibilité, 100% et 98,8% de spécificité. Le test INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA a montré de moins bons résultats avec 97,2% de sensibilité et 93% de spécificité. Cependant, tous ces tests sont assez performants pour les utiliser lors de dépistage de masse.

Récemment, un test ELISA été élaboré par l'équipe allemande de Schares en 2013. Le nouveau test Apure-BbELISA possède une sensibilité revendiquée de 100% et une spécificité de 99,8%. Il est capable de détecter l'infection à un stade très précoce de la maladie, c'est-à-

dire au même moment, légèrement avant ou 1 jour après les autres tests sérologiques de référence (IFI, WB), mais 7 ou 8 jours après le début de la fièvre. Cependant, l'infection est détectée plus tôt par RT-PCR, à partir de 1 à 3 jours après le début du stade fébrile de la maladie (Schares et al., 2013). Cette méthode demeure à tester à grande échelle.

Les nouveaux outils développés pour le diagnostic sérologique sont importants pour le contrôle de la besnoitiose bovine car ils permettent aux éleveurs de mieux détecter *B. besnoiti*, indépendamment du stade de l'infection, et ils permettent d'éviter la transmission de la besnoitiose aux bovins indemnes, par séparation des animaux infectés du reste du troupeau. Des tests avec une excellente spécificité comme l'APure-BbELISA sont nécessaires pour éviter les faux positifs, ainsi que de longues et coûteuses analyses de confirmation non nécessaires (Schares et al., 2013).

c. Western Blot (WB)

Le Western Blot, également appelé Immunoblot, est la méthode de référence (« gold standard »), alliant très bonnes sensibilité et spécificité. Cependant, elle ne peut être utilisée pour du dépistage de masse car elle est trop coûteuse et très lourde à mettre en œuvre. En effet, au laboratoire de Parasitologie de l'ENV-Toulouse, le test WB est estimé à 20 euros TTC, soit modérément plus cher que l'IFI (15 euros TTC), et bien plus cher que l'ELISA (10 euros TTC).

Les méthodes disponibles utilisent désormais des antigènes totaux (antigènes de surface et antigènes cachés) de tachyzoïtes mais aussi de bradyzoïtes. Après broyage par passage dans une aiguille fine du parasite, les protéines antigéniques sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane. La membrane révèle des zones plus sombres lorsqu'il y a réaction entre le complexe immun (anticorps-antigène) recherché et un anticorps secondaire couplé à une peroxydase.

Cortes et al. (2006a) ont adapté une technique décrite pour *N. caninum* par Staubli en 2006. La sensibilité de leur méthode est de 91,3%, et la spécificité de 97,5%. Comparativement, la spécificité est meilleure que l'ELISA donc elle est utile pour trancher lorsque l'ELISA donne des résultats trop proches du seuil de positivité, ou pour éliminer les réactions croisées possibles avec l'ELISA, donc elle permet de voir si un bovin n'est pas doublement infecté (besnoitiose et néosporose, ou besnoitiose et toxoplasmose). En 2010, Schares et son équipe ont mis au point deux nouveaux tests WB utilisant un nouveau système de notation, différent de celui instauré par Cortes et al. (2006a). Le profil type d'un sérum positif en WB selon Cortes et al. (2006a) pour la besnoitiose est la présence de bandes réparties dans trois domaines : les protéines de faible poids moléculaire (entre 12 et 20 kDa) souvent la plus difficile à voir, les protéines de 23 à 38 kDa et enfin les protéines de haut poids moléculaire (60 à 90 kDa).

Au lieu de prendre en compte ces trois domaines (figure 14) où se répartissent les bandes du WB, Schares et al. (2010) considèrent 10 bandes différentes (figure 15), aussi bien pour les tachyzoïtes (45, 40, 37, 34, 30, 27, 22, 17, 16 et 15 kDa) que pour les bradyzoïtes (41, 36, 33, 28, 26, 24, 23, 22, 20 et 18 kDa). Ces 10 bandes se répartissent dans les domaines II et III cités précédemment, le domaine I n'est plus exploité car trop de réactions croisées avec d'autres parasites en proviennent. La sensibilité est de 90%, et la sensibilité de 100%. Avec une spécificité de 100%, on écarte tous les faux positifs possibles, entre autre les réactions croisées avec des protozoaires proches telles que *N. caninum* et *T. gondii*. Lors des ces études, quelques animaux ont été diagnostiqués cliniquement positifs mais séronégatifs, il pourrait s'agir d'immunotolérance (Schares et al., 2010).

Garcia-Lunar et al. (2012) ont comparé différents WB utilisés en Allemagne, en Espagne et en France. Les méthodes allemandes et espagnoles, utilisant aussi bien les tachyzoïtes que les bradyzoïtes en condition non-réduit, ont donné les meilleurs résultats, avec quasiment 100% de sensibilité et de spécificité. Le test WB employé à l'ENV-Toulouse, utilisant des tachyzoïtes en condition réduit a donné 90,9% de sensibilité et 98,5% de spécificité. Les différences observées peuvent être expliquées par les différents protocoles, réactifs, système de notation, etc.

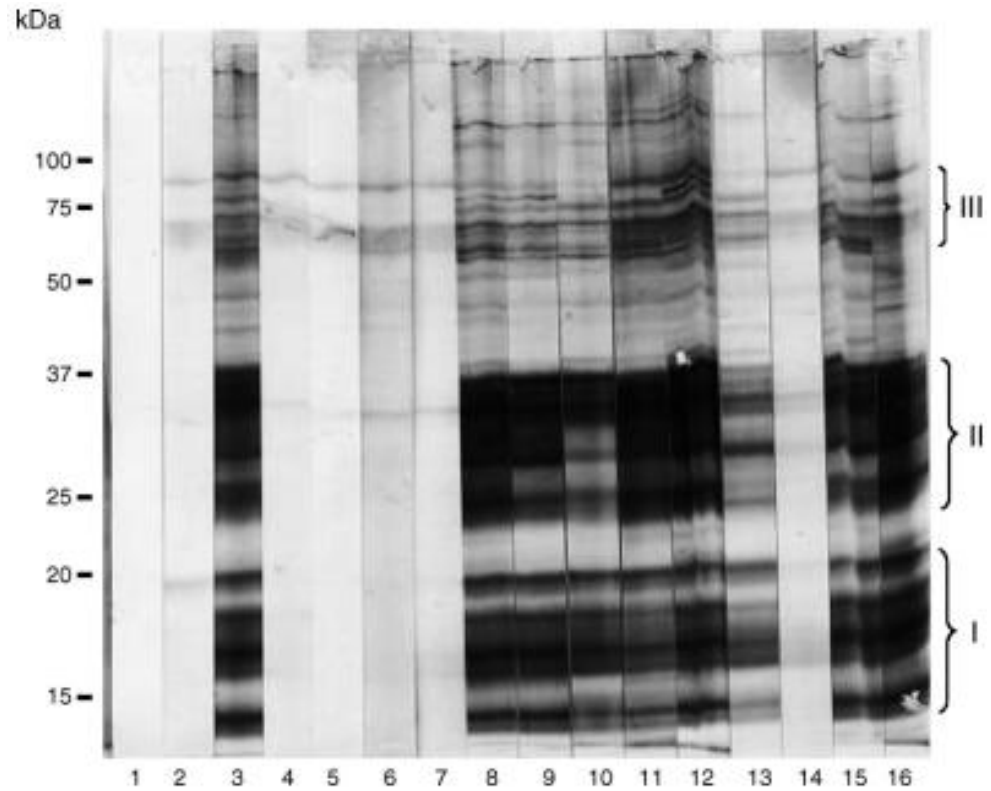


Figure 14 : Comparaison entre le Western Blot d'animaux infectés par *Besnoitia besnoiti* et d'animaux non infectés ; (1) contrôle du conjugué (absence de sérum ajouté), (2) contrôle négatif (sérum d'animal non infecté), (3) contrôle positif, (4-7) sérums d'animaux non infectés, (8-16) sérums d'animaux présentants des kystes dans la peau (révélé par histologie) ; (I, II et III) 3 domaines (Cortes et al., 2006a)

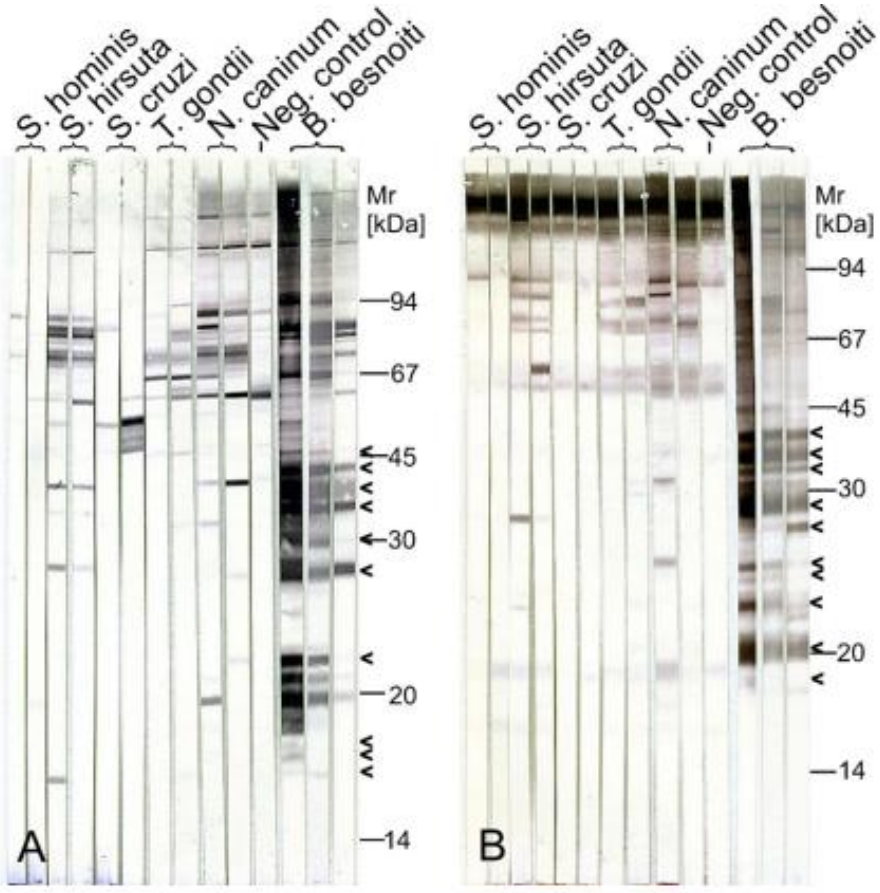


Figure 15 : Immunoblot de bovins infectés expérimentalement par différentes espèces de *Sarcocystis*, par *Toxoplasma gondii*, par *Neospora caninum* et par *Besnoitia besnoiti*, utilisant des antigènes non-réduit de tachyzoïtes (A) et de bradyzoïtes (B) de *Besnoitia besnoiti* ; (Nég. control) témoin négatif, (<) 10 antigènes séléctionnés pour le scoring de l'Immunoblot, (Mr) poids moléculaire relatif (Schares et al., 2010)

d. Réaction d'agglutination

Cette méthode détaillée par Waap (2011) permet de détecter les anticorps anti-*B. besnoiti* dans les sérums bovins. Le principe des réactions d'agglutination est de co-incuber des dilutions de sérum avec des suspensions de tachyzoïtes. Après incubation, l'agglutination est lue à l'œil nu : une réaction positive se caractérise par un voile formé au fond de la cupule ; une réaction négative se caractérise par un point noir formé au fond de la cupule (sédimentation de l'antigène). La méthode résulte de celle présentée par Fulton et Turk en 1959 pour le diagnostic de la Toxoplasmose humaine à *Toxoplasma gondii*. Puis elle a été adaptée pour la détection d'anticorps contre d'autres protozoaires proches tels que *Neospora caninum* (Romand et al., 1997 ; Packham et al., 1998) et *Sarcocystis neurona* (Linday et Dubey, 2001). Elle présente plusieurs avantages : une haute sensibilité, ainsi qu'une haute spécificité, un faible coût, et utilisable sur de nombreuses espèces, d'où un intérêt tout particulier pour l'étude épidémiologique du cycle évolutif. Durant les travaux de Waap (2011), le meilleur accord entre le test d'agglutination modifié et l'immunofluorescence indirecte a été observé à la dilution 1:160 (coefficient κ de Cohen = 0,968). La sensibilité est de 97,2% et la spécificité de 99,3%.

VI. MOYENS DE LUTTE

A. Outils thérapeutiques

1. Historique

Au début du 20e siècle, les premiers traitements faisaient appel aux diurétiques et à la saignée. Puis en 1938, Berthelon et Labeyrie eurent de bons résultats avec l'utilisation de formol en intraveineux. Mais ce traitement fut abandonné par la suite, au profit des sulfamides. La posologie recommandée à l'époque était de 9 mg/kg de PV de sulfaméthazine injectable, renouvelable à 48h ; associée à un traitement par voie orale de sulfathiazol (Thiazomide ND) à la dose de 20 g par jour pendant 2 à 5 jours. En 1979, Ubaliev et Baigaziev au Kazakhstan ont à leur tour proposé un traitement, celui-ci à base de chlorophos en topique et de lugol en injection intraveineuse. Ce dernier traitement, long (45 à 50 jours) et contraignant, donnait de bons résultats avec disparition de la plupart des kystes cutanés, une peau redevenant souple, et les poils repoussant en trois semaines (Franc et al., 1987).

2. Les sulfamides : mêmes molécules mais une posologie qui évolue !

Actuellement, il est recommandé d'utiliser en association un anti-infectieux (sulfamides) un anti-inflammatoire non stéroïdien et des diurétiques (furosémide puis thiazidique) afin de limiter les effets secondaires de la besnoitiose. L'efficacité du traitement repose sur la précocité de sa mise en place. Pour bien faire, il doit impérativement être commencé en phase fébrile ou au plus tard en phase des œdèmes (Alzieu et al., 2010).

L'utilisation des sulfamides est encore d'actualité malgré l'avancée des recherches effectuées sur la maladie. Par contre, la posologie est différente. En première intention, on recommande l'utilisation de la sulfadimérazine à la dose de 150 à 200 mg/kg PV, ou de la sulfadiméthoxine à la dose de 80 mg/kg PV. Le traitement ne doit pas être inférieur à 7 jours, dont les 2 à 3 premiers jours par voie intraveineuse lente, et la suite par voie orale. Les posologies sont difficiles à respecter sur le terrain puisque la majorité des sulfamides sont présentés en association avec du triméthoprime, et par conséquent les doses appliquées par le dossier A.M.M. ne sont pas celles permettant la guérison d'un animal atteint de besnoitiose. On se retrouve donc en sous-dosage, ce qui ne permet bien évidemment pas la guérison. Malgré tout, même si le traitement est administré rapidement et correctement, il ne faut pas oublier que l'utilisation des sulfamides ne permet pas la guérison complète du bovin, et les rechutes ne sont pas rares (Jacquiet et al., 2010). Les bovins infectés le sont à vie, ce qui signifie que même « guéris » ils sont porteurs de nombreux kystes à bradyzoïtes, forme de survie de l'espèce parasite, par conséquent ils peuvent être à tout moment de nouveau cliniques et source d'infection pour les autre bovins. La réforme de ces animaux reste un choix judicieux.

3. Autres solutions

L'efficacité des tétracyclines est aujourd'hui encore discutée. Malgré le fait que beaucoup de vétérinaires continuent à l'utiliser en première intention, son efficacité apparente serait sans doute liée à l'utilisation conjointe d'anti-inflammatoire, d'où une apparente guérison des bovins traités. Dans la zone d'endémie historique, la tétracycline fut testée à la dose de 10 mg/kg PV, mais sans résultats cliniques satisfaisants. De récents travaux réalisés sur gerbilles par Shkap et son équipe ont montré l'efficacité des tétracyclines à 100 mg/kg PV, mais ces posologies restent non utilisables sur bovin (Alzieu et al., 2011).

Des études *in vitro* ont démontré l'efficacité du thiazolide nitazoxanide et de différents dérivés de ce produit contre *B. besnoiti* cultivé dans des cellules Vero (Cortes et al., 2007b) mais d'autres études sont nécessaires pour rechercher le traitement *in vivo* des infections à *B. besnoiti*. L'utilisation du toltrazuril est une piste en cours d'exploration mais extrêmement onéreuse à la posologie recommandée de 40 mg/kg *per os* chez des bovins adultes et hors A.M.M.

B. Mesures de prévention

1. Prophylaxie médicale

L'utilisation d'antibiotique par mesure préventive est inconcevable. La vaccination quant à elle est discutable mais pour le moment elle est indisponible en Europe (Jacquiet et al., 2010). En Afrique du Sud, les mesures de prophylaxie médicale font appel à un vaccin vivant atténué, celui-ci préparé à partir de tachyzoïtes récoltés sur une souche de *Besnoitia besnoiti* provenant du Gnou bleu. L'immunité à médiation cellulaire mise en place dure 4 ans (Euzéby, 1987) et prévient l'apparition des symptômes. Cependant, les animaux restent porteurs asymptomatiques. En Israël, la pratique vaccinale mise en place depuis 1986 sur les taureaux reproducteurs donne de très bons résultats (Pipano et al., 1997). Les vaccins vivants atténués utilisés sont également produits à partir de tachyzoïtes. En Europe, si la situation d'enzootie persiste dans certaines régions, il n'est pas exclu que la vaccination apparaisse, du moins pour protéger les animaux sensibles (taureaux reproducteurs) (Alzieu et al., 2011).

En appui à ces mesures vaccinales, il est important de ne pas négliger le contrôle des insectes vecteurs de la maladie. Pour cela, la lutte fait appel aux pyréthrinoïdes de synthèse, le plus souvent appliqués en *pour-on* sur le dos des bovins. Un des avantages de ces molécules est sans nul doute son pouvoir rémanent de plusieurs semaines. Les pyréthrinoïdes de synthèse agissent contre les mouches des cornes (*Haematobia irritans*), les Hippoboscidae et les mouches lécheuses (*Musca autumnalis et M. domestica*). Par contre, son activité dépend entre autre du temps de contact des mouches avec le bovin. Par conséquent, la protection apportée n'est pas similaire selon les espèces de mouches. A priori, elle est même diminuée pour les taons et les stomoxes qui passent en général moins de temps que les mouches des cornes sur les bovins. Il parait donc difficile de proposer un plan de lutte efficace contre ces deux espèces vectrices de *B. besnoiti* puisque le but serait de prévenir toute piqûre ou tout risque de transmission mécanique. La lutte future pourrait s'intéresser aux stades plus précoces de ces vecteurs.

2. Prophylaxie sanitaire (Alzieu et al., 2011 ; Jacquiet et al., 2010)

La seule prophylaxie efficace reste donc sanitaire. Les différentes mesures de contrôles relèvent donc de principes de bases et sont à adapter selon le type de cheptel rencontré.

a. Les principes de base

Une conduite à tenir rigoureuse est la clé d'une bonne gestion de la maladie. En cas de mise en évidence de besnoitiose dans un troupeau auparavant indemne, il est conseillé de suivre 3 étapes : la première indique comment gérer l'animal malade d'un point de vue sanitaire, la seconde détaille la gestion du reste du troupeau, et la dernière la gestion des insectes vecteurs (figure 16).

En fonction de l'état sanitaire du troupeau, et après calcul de la séroprévalence, on est en mesure de choisir une stratégie de gestion sanitaire adaptée.

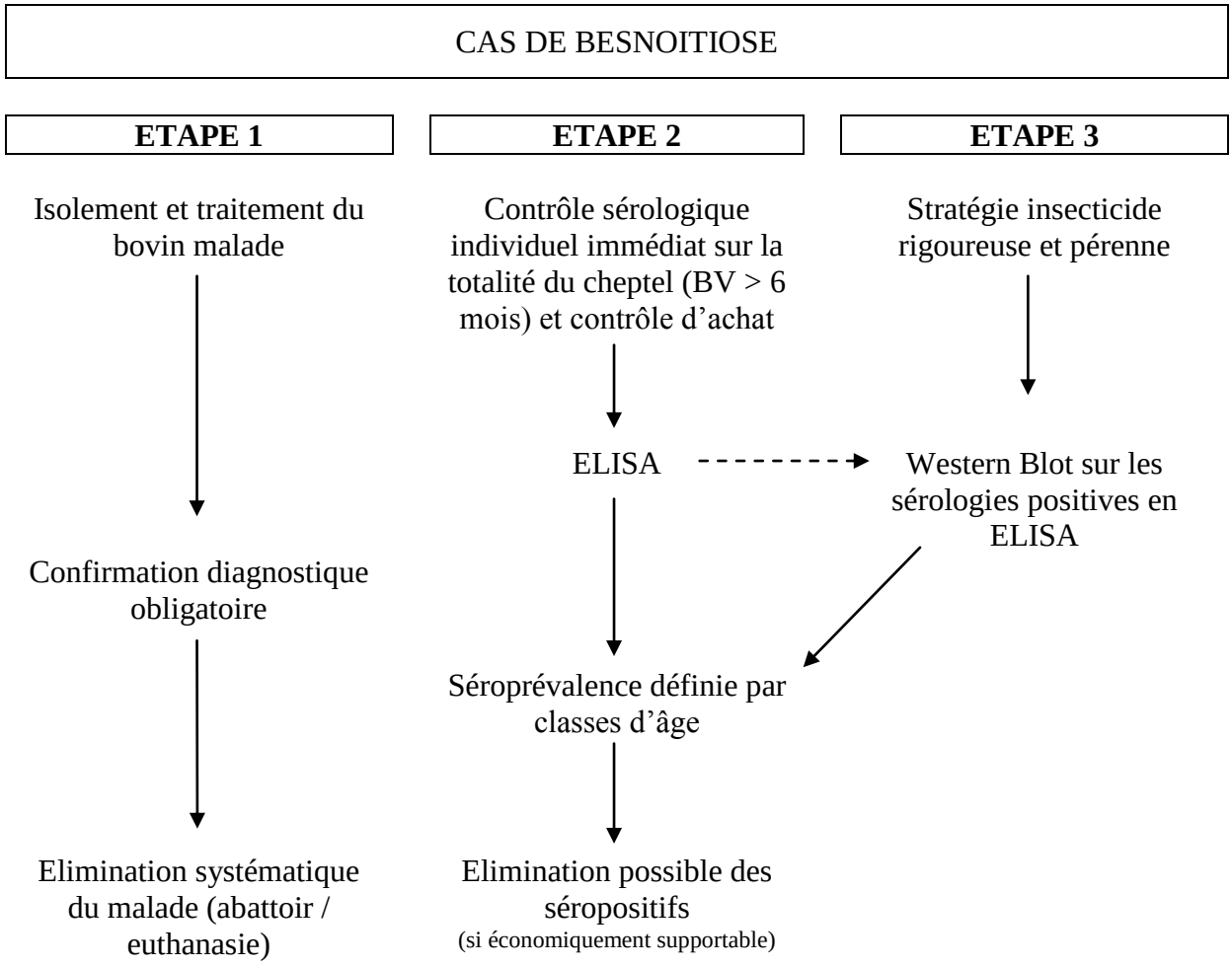


Figure 16 : Proposition de conduite à tenir au cas de dépistage positif de besnoitiose dans un élevage auparavant indemne (Alzieu et al., 2010)

b. Le contrôle dans les cheptels infectés

Il consiste en l'élimination des animaux malades (porteurs latents du parasite) même cliniquement guéris, ainsi que des animaux présentant des kystes oculaires. Il s'agit là de la population à haut risque de transmission du parasite. En plus, il est nécessaire de tester la séroprévalence par ELISA dans le reste du troupeau.

- Si la séroprévalence est faible (< 10%) : l'élimination des animaux séropositifs est envisageable si les cheptels voisins sont *a priori* « sains » (testés négativement par ELISA). De plus, il est absolument primordial d'instaurer un contrôle sérologique à l'achat de tout nouvel individu dans le cheptel.

- Si la séroprévalence est élevée (> 30%) : l'élimination des animaux séropositifs est économiquement difficilement envisageable (manque à gagner, coût de renouvellement). L'éleveur doit « vivre avec la maladie », et d'après des observations de terrain, il semble qu'un relatif état de stabilité endémique se mette en place progressivement, avec à terme peu de cas cliniques. Il est tout de même important de ne pas négliger le contrôle des insectes vecteurs pour limiter les transmissions et l'apparition de nouveaux cas cliniques.

c. Le contrôle et la protection en cheptels indemnes

Il consiste en plusieurs principes de protection :

- un contrôle sérologique « obligatoire » à l'achat de tout bovin de plus de 5-6 mois d'âge, notamment ceux provenant de zones d'endémie y compris les jeunes bovins (futurs taurillons en vue d'engraissement par exemple).

- Et si possible, il serait sage de refaire un second contrôle à 6 semaines afin de dépister les animaux faussement séronégatifs (contamination tardive et en cours de séroconversion au moment du premier test).

- Enfin, il est absolument indispensable de mettre en place un plan de lutte contre les insectes vecteurs dont les modalités se réfléchissent élevage par élevage.

CHAPITRE 2 :

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE DE LA BESNOITIOSE BOVINE A BESNOITIA BESNOITI

I. OBJECTIFS DE L'ETUDE

La Besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti* est une maladie reconnue émergente en Europe en 2010 par l'Agence Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA). Seulement quelques bovins atteints développent les signes typiques de la maladie, et sont facilement identifiables quand apparaissent les kystes parasitaires au niveau de la sclère ou de la conjonctive. Certains de ces animaux constituent des non-valeurs économiques, tandis que d'autres sont porteurs de kystes sans que cela ne freine leur production (*e.g.* lait). La plupart des bovins demeurent asymptomatiques (« porteurs sains »), et forment un réservoir du parasite qu'il est essentiel d'identifier au plus vite.

A cet effet, les outils diagnostiques ont besoin d'être standardisés (Garcia-Lunar et al., 2012). Actuellement, les techniques diagnostiques incluent l'histophatologie (Basson et al., 1970), la cytologie à partir de conjonctive (Sannusi, 1991) ou de muqueuse vaginale, la Polymerase Chain Reaction (Cortes et al., 2007a) et plusieurs techniques sérologiques basées sur l'ELISA (Janitschke et al., 1984 ; Shkap et al., 1984 ; Fernández-García et al., 2010 ; Schares et al., 2011), le Western Blot (Cortes et al., 2006b ; Schares et al., 2010), le test d'agglutination (Waap et al., 2011) et l'immunofluorescence indirecte (Janitschke et al., 1984 ; Shkap et al., 2002 ; Schares et al., 2010 ; García-Lunar et al., 2012).

L'IFI a été mise au point dans différents laboratoires européens (Portugal, Espagne, Allemagne). A l'Institut Friedrich Loeffler (Allemagne), Schares et al. (2010) ont montré une meilleure sensibilité de l''immunofluorescence indirecte par rapport au Western Blot, revendiquant une sensibilité de 92% et une spécificité de 100% au seuil de 1:200. Malgré ces excellents résultats, ces derniers ne peuvent être transposés directement à d'autres équipes de recherche. Des variations de sensibilité et de spécificité peuvent survenir du fait par exemple de la souche de *B. besnoiti* utilisée et de l'expérience du lecteur. La mise au point de l'immunofluorescence indirecte au laboratoire de parasitologie de l'ENV-Toulouse permettrait de compléter le kit de diagnostic actuellement disponible pour la besnoitiose bovine, qui se compose de l'ELISA (kit commercial PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 du laboratoire PRIONICS) et du Western Blot utilisant les tachyzoïtes en condition non-réduit. Le laboratoire de Parasitologie a souhaité estimer les caractéristiques propres de son IFI et de disposer ainsi d'un troisième test permettant de lever les incertitudes concernant le statut sérologique d'un animal dans les situations suivantes : WB négatif et ELISA positif (fréquent), ou WB positif et ELISA négatif (rare).

L'objectif de mon travail de thèse a été de définir les spécificités propres de l'IFI à partir d'une banque de 403 sérums de bovins pour lesquels le statut immunologique vis-à-vis de la besnoitiose a été estimé par WB et pour la plupart par ELISA et d'envisager les possibilités d'optimisation.

II. MATERIELS ET METHODES

A. Banque de sérums bovins

Durant cette étude, 403 sérums ont été analysés. Ils proviennent pour la quasi-totalité de différents départements français du sud du pays, dont entre autre l'Ariège, l'Aude, le Tarn, le Gers, l'Ardèche, la Drôme, et fournis par des vétérinaires praticiens ou des Groupes de Défense Sanitaire. Le statut clinique des animaux et leur historique (élevage de naissance et déplacements ultérieurs) n'ont pas été fournis avec l'envoi des sérums. L'absence de ces données empêche notamment une étude géographique de la besnoitiose bovine ainsi que la recherche d'une corrélation entre taux d'anticorps et présence de kystes.

Tous les sérums ont été testés au préalable par WB dans le laboratoire de Parasitologie de l'ENV-Toulouse, et par ELISA dont les résultats nous ont été fournis par le Laboratoire Vétérinaire Départementale de l'Ariège. La valeur seuil de Densité optique (DO) de l'ELISA a été fixée à 15 par le fabricant. Cependant, nous avons analysé nos résultats avec deux autres seuils (10 et 20 de DO) dans le but d'estimer la possibilité d'une optimisation concernant la banque des sérums étudiés ici.

Le panel comprend les groupes d'échantillons suivants :

1. Sérums « standards » (n = 232)

Les sérums réellement positifs (n = 121) ont été obtenus à partir d'animaux naturellement infectés à *B. besnoiti*. La séropositivité a été doublement mise en évidence par la présence d'anticorps anti-*B. besnoiti* par Western Blot (d'après la méthode décrite par Cortes et al., 2006a) ainsi que par ELISA (kit commercial PRIONICS).

Les sérums vrais négatifs (n = 111) ont été obtenus à partir de bovins ayant été confirmés négatifs également par WB et ELISA.

2. Sérums « douteux » (n = 110)

Parmi l'ensemble d'échantillons de sérums dits « douteux », un seul cas de figure a été observé. Il s'agit des sérums ayant réagi négativement au WB et positivement à l'ELISA.

3. Sérums de bovins séropositifs à *Neospora caninum* ou *Toxopasma gondii* par ELISA (n = 57)

Une étude parallèle a été réalisée pour évaluer la spécificité de l'Immunofluorescence indirecte (IFI) en recherchant d'éventuelles réactions croisées avec les anticorps dirigés contre *N. caninum* et *T. gondii,* des parasites proches appartenant au phylum des Apicomplexa et affectant également les bovins. Les sérums utilisés pour étudier la spécificité à *N. caninum* (n

= 32) proviennent de bovins élevés en Ariège et nous ont été transmis par le Dr. Jean-Pierre Alzieu du Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ariège. Les sérums utilisés pour étudier la spécificité à *T. gondii* (n = 25) nous ont été aimablement fournis par le Dr. Radu Blaga de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. La séropositivité à *N. caninum* avait été mise en évidence par ELISA, et celle de *T. gondii* avait été mise en évidence par Agglutination Directe Haute Sensibilité (ADHS). Tous les sérums se sont révélés négatifs vis-à-vis de *B. besnoiti* lors de leur examen par WB.

4. Autres sérums (n = 4)

Quatre sérums n'ont pas été testés par ELISA, d'où l'impossibilité de les faire appartenir à un des groupes présentés ci-dessus. Trois sont WB négatifs et un WB positif. Ils ont toutefois été intégrés pour la comparaison entre l'IFI et le WB.

B. Production de *Besnoitia besnoiti*

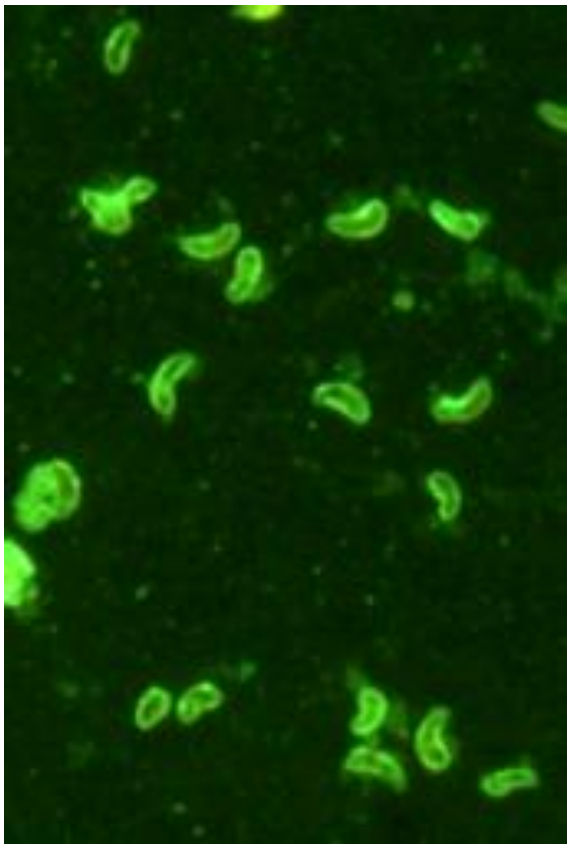
Les parasites *B. besnoiti* utilisés pour la préparation des lames d'IFI ont été obtenus à partir d'une vache de race Aubrac naturellement infectée au dernier stade de la maladie et autopsiée à l'ENV de Toulouse. Le protocole écrit par le service de Parasitologie (annexes 1 et 2) est inspiré de l'article publié par Cortes et al. (2006b). A partir de kystes prélevés dans la peau du bovin, les bradyzoïtes ont été mis en culture par passage dans des cellules Vero (cellules rénales de singe) jusqu'à leur transformation en tachyzoïtes au bout de 20 jours. Les tachyzoïtes sont maintenus dans les cellules Vero avec des repiquages hebdomadaires jusqu'à leur utilisation pour l'étape suivante. Ces cellules Vero ont été cultivées dans des flasques à l'aide d'un milieu de culture complet à base de MEM 1X (Minimum Essential Medium), AANE 100X (Acides Aminés Non Essentiels), nystatine, pénicilline, streptomycine, et 10% de sérum de veau fœtal inactivé.

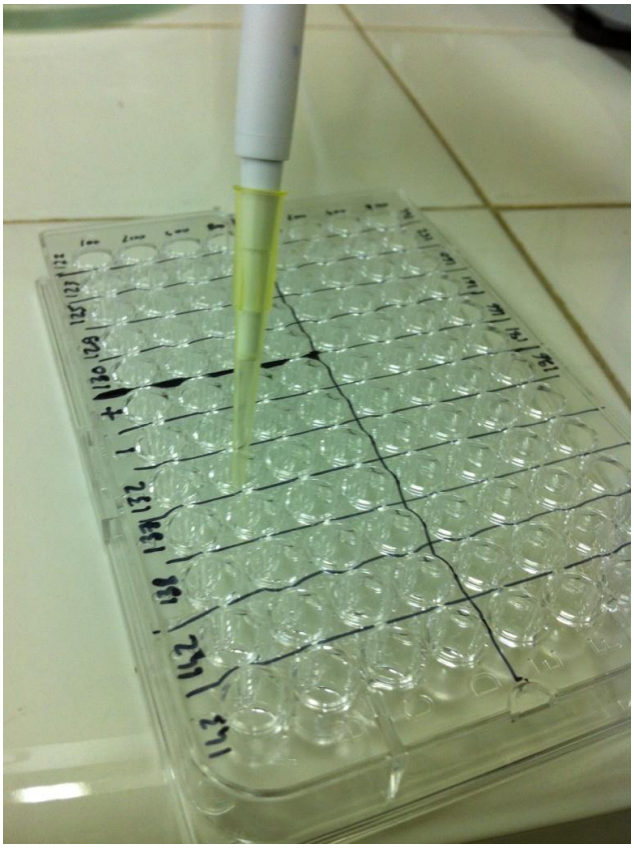
C. Fixation sur lame de l'antigène

Les lames d'IFI ont été préparées à partir des flasques de culture présentées ci-dessus et le protocole a été adapté de Shkap et al. (2002). Le surnageant des flasques qui contient les tachyzoïtes en suspension est collecté. Après quelques lavages et centrifugations, on récupère 1 ml de tachyzoïtes en suspension dans du PBS. Ce volume est additionné à 1 ml de formaldéhyde à 36% pour la préservation des parasites. Après trois lavages et centrifugations, le culot de parasites est conservé dans 1 ml de PBS. L'étape suivante vise à ajuster la concentration de 2.10^6 tachyzoïtes ml^{-1}. Cette valeur a été déterminée par différents tests de dilution de la concentration de tachyzoïtes (voir plus bas). Enfin, cette solution est déposée dans chacun des 8 puits présents sur chaque lame d'immunofluorescence, et est séchée une heure à 37°C. Les tachyzoïtes sont définitivement fixés à l'aide d'acétone conservée à -20°C. Les lames sont séchées et enroulées dans du papier Whatman entourées de papier en aluminium. Elles sont conservées à -70°C pour une utilisation ultérieure.

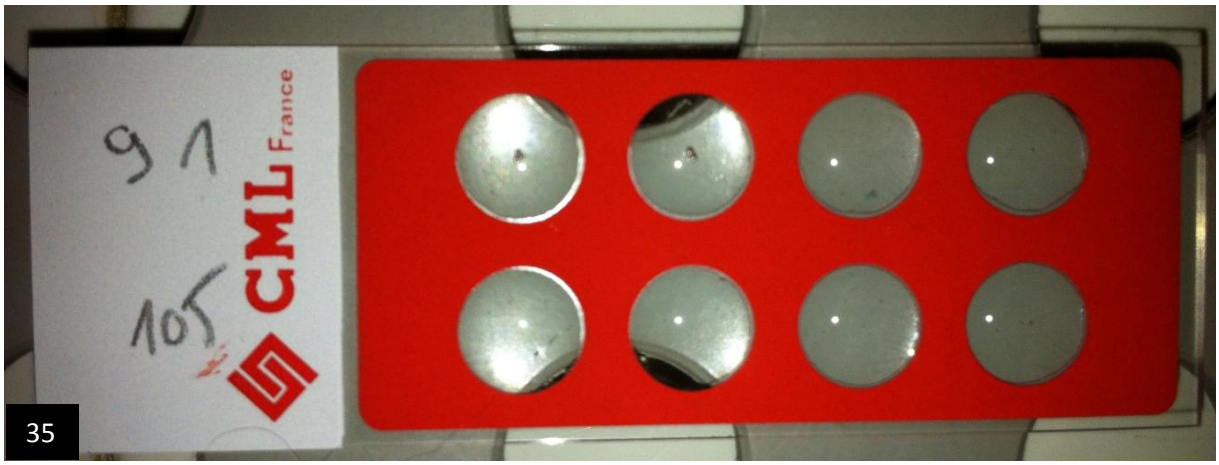
D. Tests des sérums par Immunofluorescence Indirecte

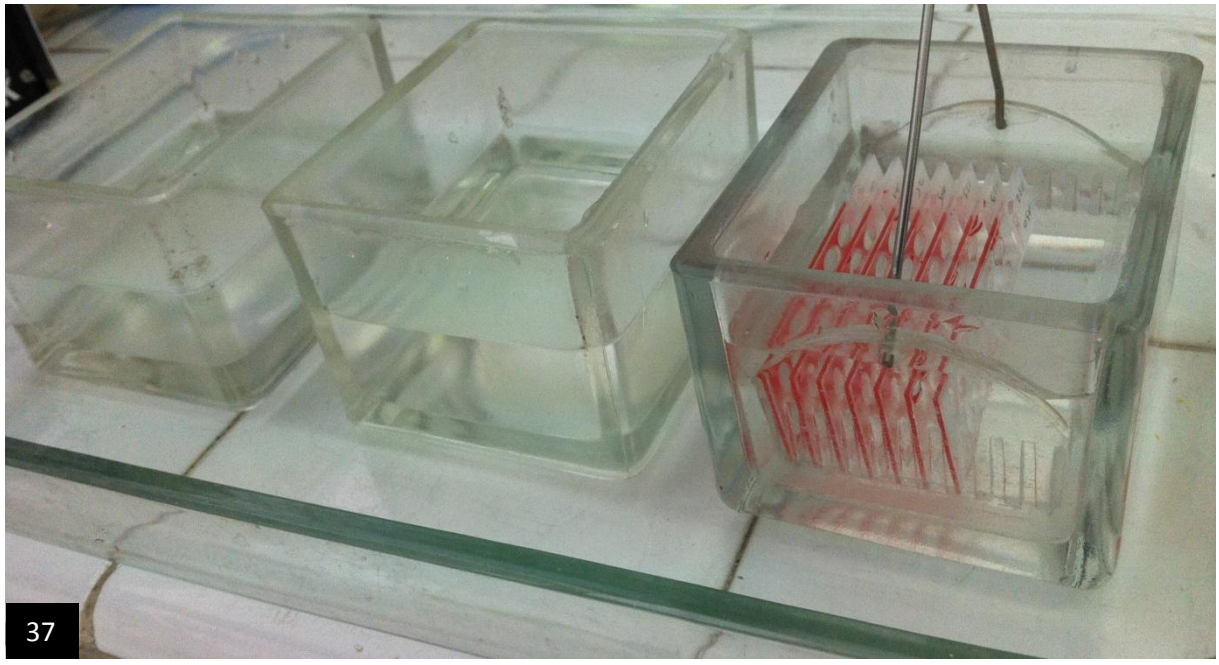
Les sérums ont été testés à quatre dilutions différentes : 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 auxquelles sont jointes deux solutions témoins (une positive et une négative) (photo 34). Les solutions sont déposées dans chacun des puits (photo 35), et les lames sont placées en chambre humide à 37°C pendant 45 minutes (photo 36). Elles sont ensuite lavées trois fois dans de l'eau distillée (photo 37) puis séchées. L'étape suivante consiste à déposer dans les puits le conjugué anti-IgG bovines marquées à la fluorescéine (FITC) dilué au 1:300, ainsi que le Bleu Evans dilué au 1:20 (photos 38 et 39). La dernière étape d'incubation est réalisée en chambre humide. Les lames sensibilisées sont lavées puis séchées. Juste avant la lecture, on dépose le milieu de montage Fluoprep® dans chaque puits (photo 40). Ce gel permet la fixation de la lamelle sur la préparation microscopique à destination d'un examen d'immunofluorescence. On termine en mettant en place une lamelle couvrant l'ensemble des puits afin de limiter le contact avec l'air. La lecture des résultats a été réalisée au microscope à ultraviolets au grossissement x400 par un seul et même observateur. Une fluorescence ininterrompue sur tout le contour du tachyzoïte à la dilution 1:200 (photo 33) a été considérée comme seuil de positivité, en accord avec Shkap et al. (2002).



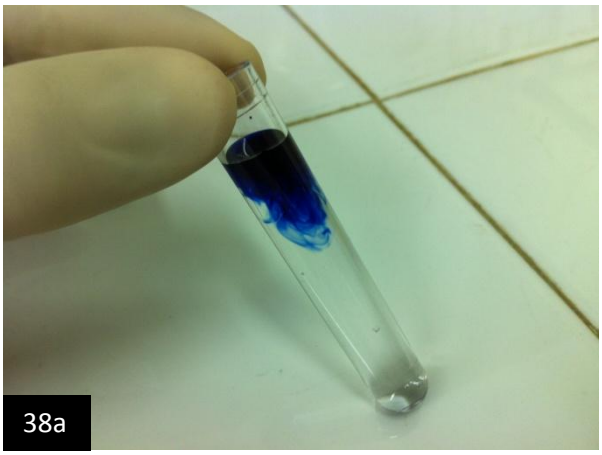


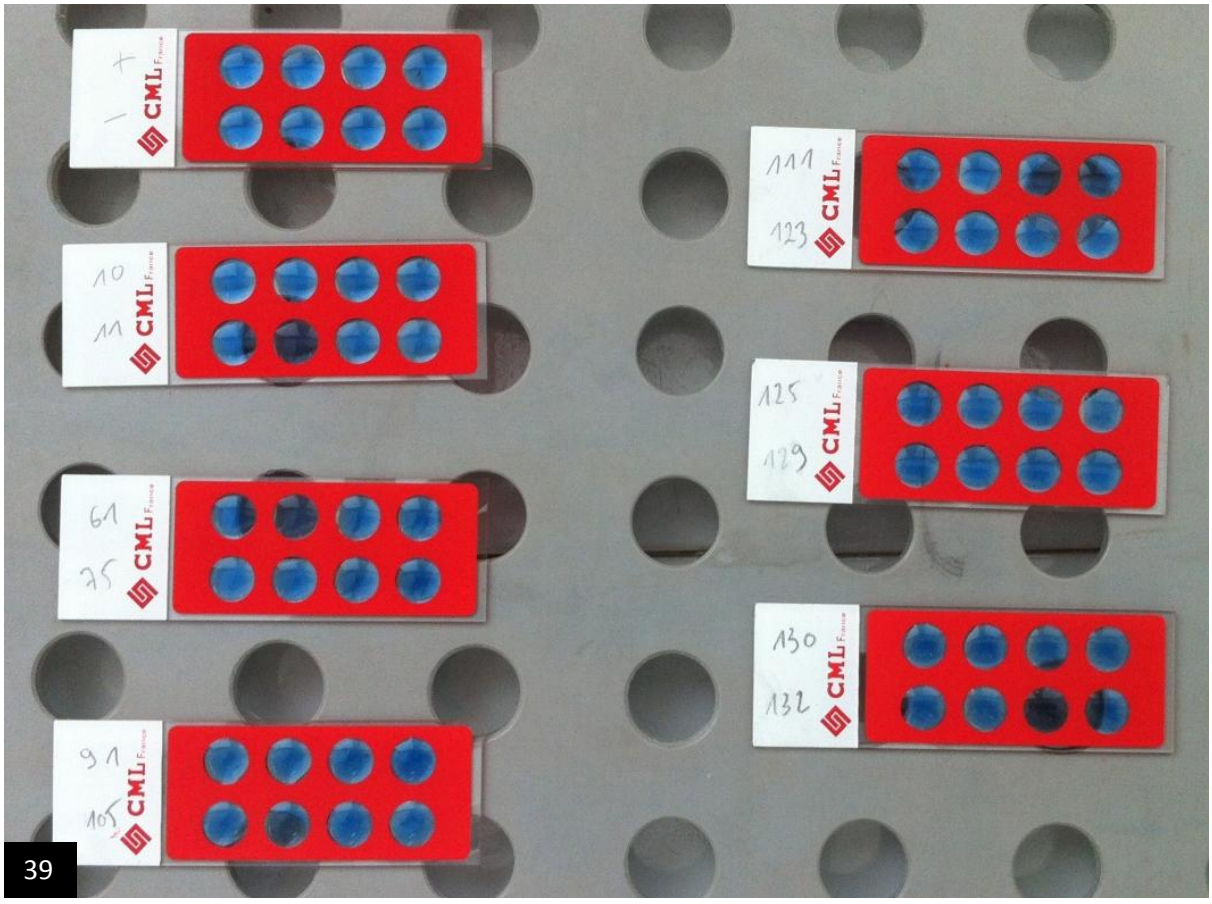
Photos : (33) Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » à la dilution 1:200, au grossissement x1600. (F. Lenfant).
(34) Préparation des dilutions au 1 :100, 1 :200, 1 :400, 1 :800 des différents sérums à tester, ainsi que des témoins positifs et négatifs. (F. Lenfant).





Photos : (35) Dépôt des préparations dans les puits pour les sérums n°91 et n°105. (F. Lenfant).
(36) Incubation en chambre humide 45 min à 37°C. (F. Lenfant).
(37) Rinçage des lames dans de l'eau distillée. (F. Lenfant).





Photos : (38a, b) Préparation de Bleu Evans à 0,05%. (F. Lenfant).
(39) Dépôt des préparations (Conjugué / Bleu Evans) dans les puits. (F. Lenfant).

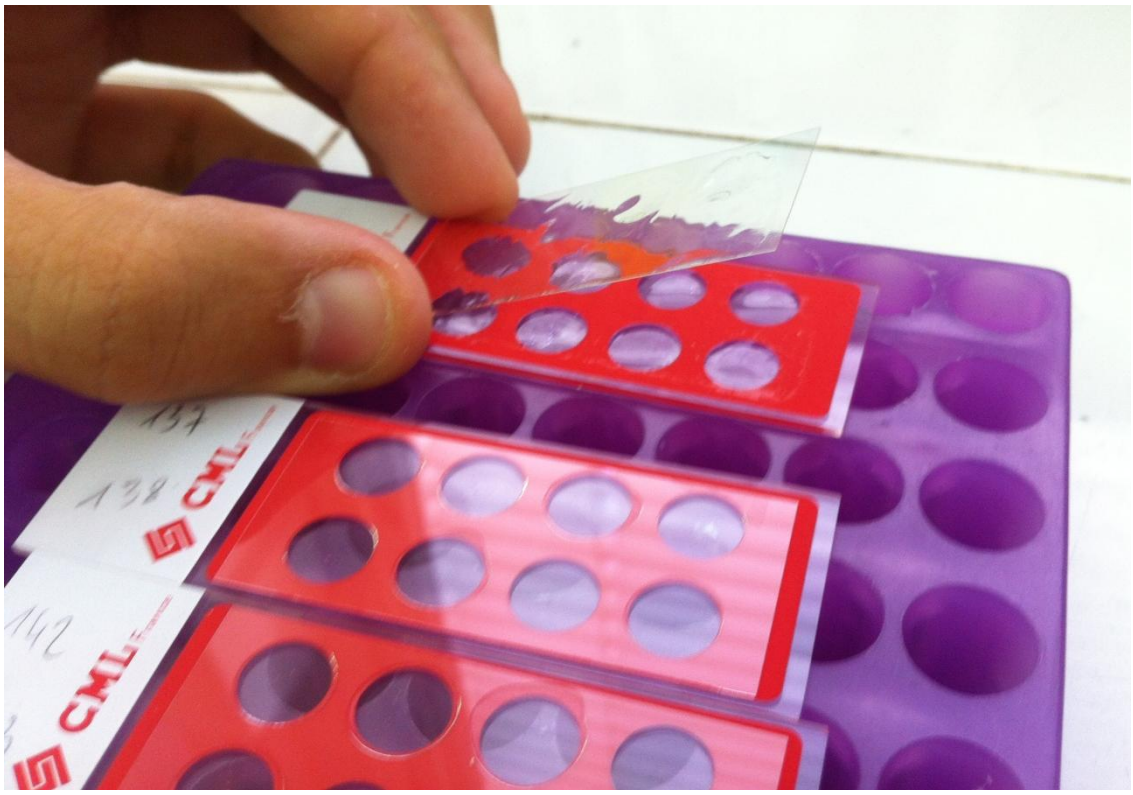


Photo 40 : Dépôt de Fluoprep® dans chaque puits, puis mise en place d'une lamelle par lame. (F. Lenfant).

E. Détermination de la dilution optimale de la solution de tachyzoïtes

Pour déterminer la concentration optimale de tachyzoïtes sur la lame, une des étapes de la fixation de l'antigène sur lame a été optimisée. Pour cela, on a testé différentes dilutions de tachyzoïtes : 5.10^6, 2.10^6, 1.10^6, 1.10^5, 1.10^4, 1.10^3, 100, 50, 25, 10, 5, 1 ml^{-1}.

F. Analyse des données

Les résultats ELISA et WB préalablement obtenus ont été comparés pour calculer les performances de l'ELISA en considérant le WB comme test de référence. Ces valeurs ont permis d'avoir une approche comparative similaire entre l'IFI et l'ELISA.

Les performances de l'IFI ont été évaluées en utilisant également le Western Blot comme test de référence (Gold standard).

Les calculs ont été effectués à l'aide d'un tableur Excel et du add-on DAG_Stat (Mackinnon, 2000). La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives de l'ELISA et de l'IFI ont été déterminées respectivement pour chacune des trois DO (10, 15 et 20) et des quatre dilutions de sérums (1:100, 1:200, 1:400 et 1:800). Les concordances entre

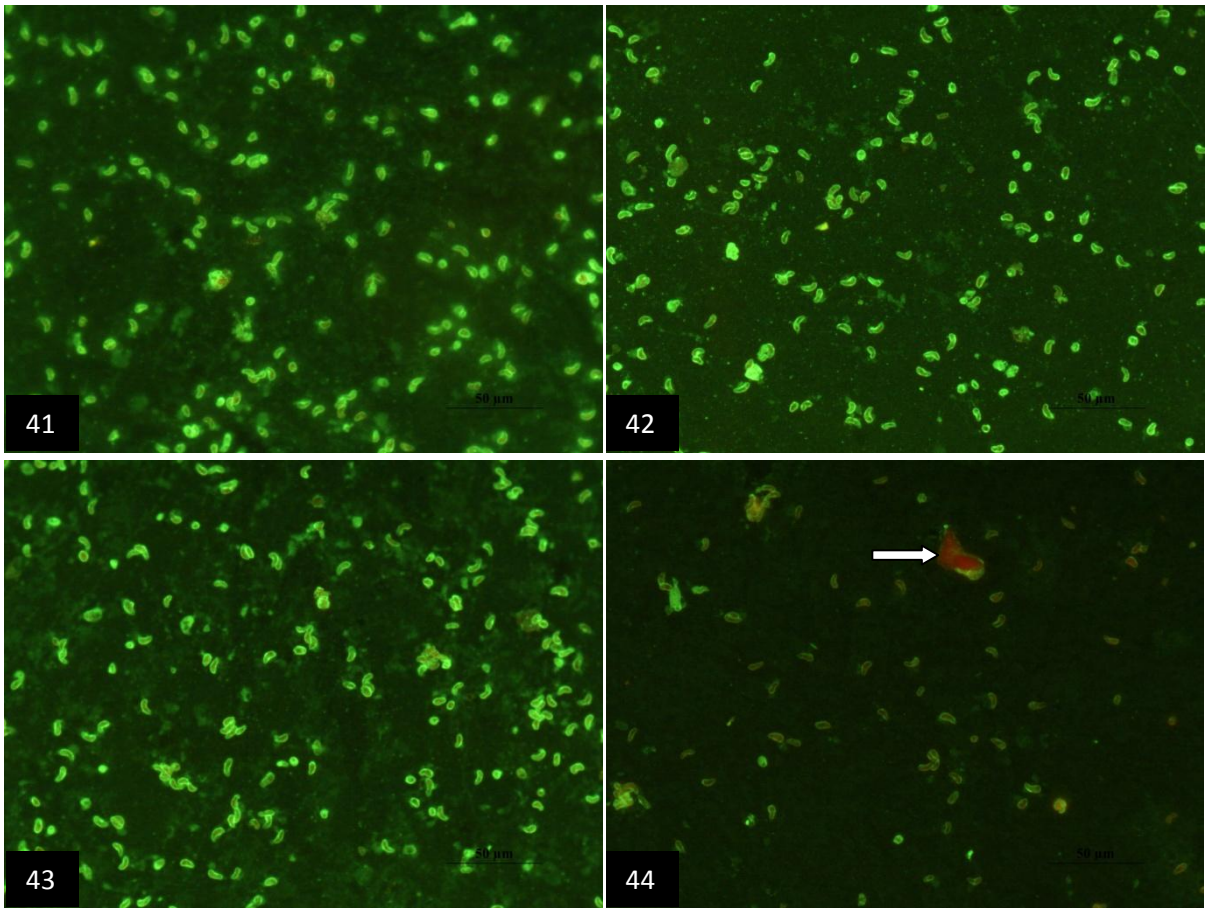
les résultats observés à chaque DO et à chaque dilution ont été calculées en utilisant des tableaux de contingence et ont été définies comme étant la proportion d'accord global entre les résultats des deux tests comparés. Le coefficient Kappa de Cohen (κ) a été utilisé pour calculer ce degré d'accord (Landis & Koch, 1977). Il a été évalué selon les critères suivants: 0.00 = très mauvais, 0.01-0.20 = mauvais, 0.21-0.40 = médiocre, 0.41-0.60 = moyen, 0.61-0.80 = bon, 0.81-1.00 = accord quasi parfait (Everitt, 1989).

III. RESULTATS

A. Photographies au microscope à ultra-violets

1. Témoin positif

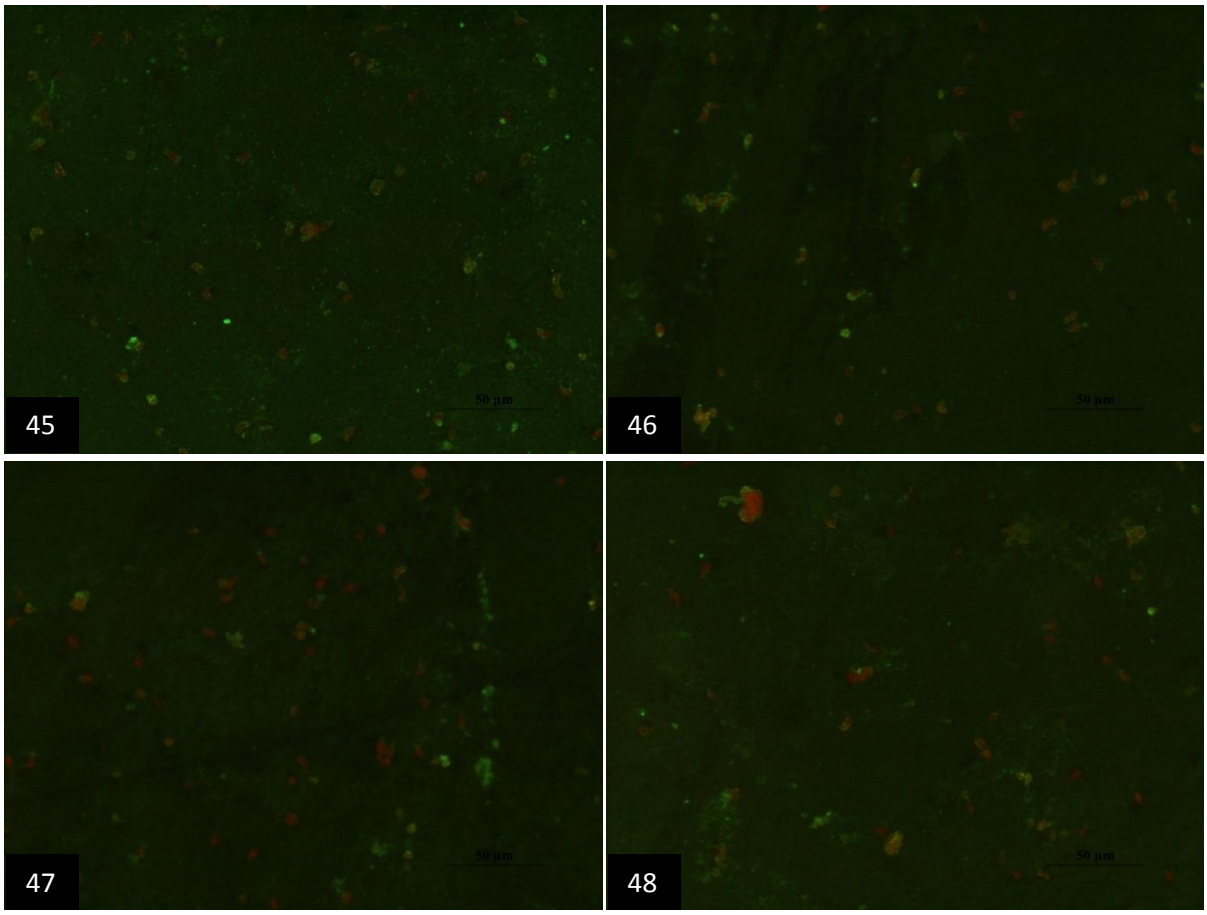
Au grossissement x400, les tachyzoïtes observables sur une lame de témoin positif (photos 41 à 44) présentent un liserai fluorescent ininterrompu sur toute leur périphérie. Cette fluorescence tend à diminuer lorsque la dilution augmente.



Photos : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin positif » au microscope à UV, x400 ; (41) dilution 1:100 ; (42) dilution 1:200 ; (43) dilution 1:400 ; (44) dilution 1:800 ; artefact (flèche). (F. Lenfant).

2. Témoin négatif

Au grossissement x400, les tachyzoïtes observables sur une lame de témoin négatif (photos 45 à 48) ne présentent pas de fluorescence sur la totalité de leur périphérie, voire aucune, ce qui laisse apparaitre la couleur rougeâtre que prennent les parasites lorsqu'ils sont observés par microscopie optique à ultraviolets.

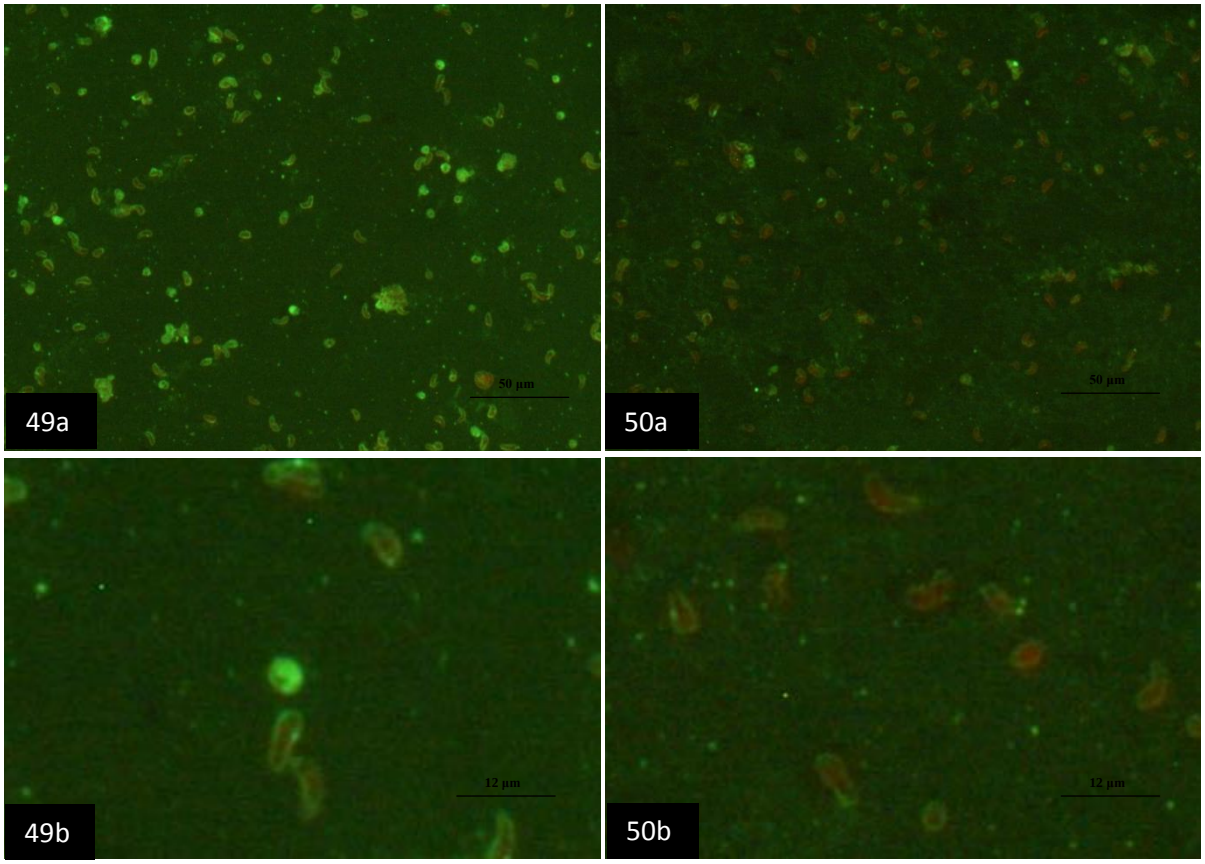


Photos : Observation de tachyzoïtes sur une lame « témoin négatif » au microscope à UV, x400 ; (45) dilution 1:100 ; (46) dilution 1:200 ; (47) dilution 1:400 ; (48) dilution 1:800. (F. Lenfant).

3. Sérums problématiques

Au grossissement x400, les tachyzoïtes peuvent présenter une diminution rapide de leur fluorescence d'une dilution à la suivante (photos 49 et 50), ce qui peut parfois être gênant pour décider du statut sérologique de l'échantillon examiné. Dans l'exemple pris pour les photographies 49 et 50, la fluorescence diminue grandement entre la dilution 1:200 et 1:400, malgré tout une fluorescence est présente sur la périphérie des tachyzoïtes à la dilution 1:400, mais celle-ci est distribuée de manière plus hétérogène et sa luminosité est plus faible. Ceci pose un problème pour le lecteur qui observe la lame au grossissement x400 seulement. Le problème se présente véritablement lorsque l'on se trouve dans cette configuration entre les dilutions 1:100 et 1:200 puisque cette dernière a été fixée comme seuil décisionnel. Cette difficulté souligne une limite importante de l'IFI dont l'interprétation de la fluorescence

repose alors dans cette situation sur l'expérience du diagnosticien introduisant de façon sensible une part de subjectivité.



Photos : Observation de tachyzoïtes sur une lame de sérum « douteux » au microscope à UV ;
(49) dilution 1:200 : (a) x400 (b) x1600 : fluorescence sur la totalité de la périphérie des parasites ;
(50) dilution 1:400 : (a) x400 (b) x1600 : fluorescence hétérogène et clairsemée sur la périphérie des parasites (F. Lenfant).

B. Optimisation de l'IFI

Seule la dilution 2.10^6 ml^{-1} a donné un beau tapis uniforme de tachyzoïtes sur toute la lame. Avec une dilution de 5.10^6 ml^{-1}, on obtenait un tapis « surpeuplé » de tachyzoïtes et la lecture n'était pas claire. A la dilution de 1.10^6 ml^{-1}, le tapis de tachyzoïtes n'était pas uniforme et trop peu de tachyzoïtes étaient présents. Pour les dilutions suivantes (de 1.10^5 à 1 ml^{-1}), l'observation ne donnait que peu de tachyzoïtes, voire aucun.

C. Comparaison des résultats ELISA et WB

Trois cent quarante-deux sérums ont été analysés pour calculer les performances de l'ELISA (tableau 6) :

Lorsque l'on applique un seuil de positivité à une DO 10, l'ELISA montre 171 faux positifs et aucun faux négatif (tableau 5), traduisant une sensibilité (tableau 6) de 100% et une spécificité de 22,6% (95% IC : 17,3 – 28,7%). A ce même seuil, la valeur prédictive positive (VPP) est de 41,4% (95% IC : 35,7 – 47,3%) et la valeur prédictive négative (VPN) est de 100%, ce qui représente respectivement la probabilité qu'un test soit positif au WB s'il est positif à l'ELISA (autrement dit, qu'un bovin soit malade si l'ELISA est positif), et la probabilité qu'un test soit négatif au WB s'il est négatif à l'ELISA (autrement dit, qu'un bovin ne soit pas malade si l'ELISA est négatif). Avec un seuil fixé à une DO 15 (valeur donné par le fabricant), la sensibilité est également de 100% alors que la spécificité est de 50,2% (95% IC : 43,4 – 57,0%). Ceci est dû respectivement à l'absence de faux négatifs et à la diminution du nombre de faux positifs (n = 110). A ce même seuil, la VPP est de 52,4% (95% IC : 45,7 – 59,0%) et la VPN est de 100%. Enfin, si le seuil est fixé à une DO de 20, on observe une diminution de la sensibilité à 90,4% (95% IC : 83,8 – 94,9%) alors que la spécificité augmente à 85,3% (95% IC : 79,8 – 89,7%), ce qui est due respectivement à l'augmentation des faux négatifs (n = 12) et à la diminution du nombre de faux positifs (n = 32). La VPP est de 77,9% (95% IC : 70,3 – 84,4%) et la VPN est de 93,9% (95% IC : 89,6 – 96,8%).

			Western Blot	
	Densité Optique	Résultats	+	-
ELISA	10	+	121	171
		-	0	50
	15	+	121	110
		-	0	111
	20	+	113	32
		-	12	185

Tableau 5 : Comparaison des résultats de l'ELISA et du WB pour les 342 sérums présentant un résultat ELISA (groupes « standards » et «douteux »).

Le degré d'accord entre le test de référence (WB) et l'ELISA est « très mauvais » lorsque la DO est fixée à 10, avec $\kappa = 0,171$ (95% IC : 0,122 – 0,221). Il devient « moyen » pour une DO de 15, avec $\kappa = 0,417$ (95% IC : 0,344 – 0,490). Enfin, il est « bon » pour une DO de 20, avec $\kappa = 0,732$ (95% IC : 0,658 – 0,805). Le meilleur accord est atteint pour un seuil fixé à une DO de 20 (tableau 6).

	Densité Optique	% Se (95% IC)	% Sp (95% IC)	% VPP (95% IC)	% VPN (95% IC)	κ (95% IC)
Total (n = 342)	10	100	22,6 (17,3 – 28,7)	41,4 (35,7 – 47,3)	100	0,171 (0,122 – 0,221)
	15	100	50,2 (43,4 – 57,0)	52,4 (45,7 – 59,0)	100	0,417 (0,344 – 0,490)
	20	90,4 (83,8 – 94,9)	85,3 (79,8 – 89,7)	77,9 (70,3 – 84,4)	93,9 (89,6 – 96,8)	0,732 (0,658 – 0,805)

Tableau 6 : Sensibilité, spécificité et accord de l'ELISA par rapport au WB (Gold standard), en considérant les 342 sérums présentant un résultat ELISA (groupes « standards » et «douteux »).

D. Performances de l'IFI

Lorsque l'on applique un seuil de positivité à la dilution 1:100, l'IFI montre sept faux négatifs et quinze faux positifs (tableau 7), traduisant une sensibilité (tableau 8) de 94,3% (95% IC : 88,5 – 97,7%) et une spécificité de 94,7% (95% IC : 91,4 – 97,0%). A ce même seuil, la VPP est de 88,5% (95% IC : 81,7 – 93,4%) et la VPN est de 97,4% (95% IC : 94,8 – 99,0%). Avec un seuil appliqué à la dilution 1:200, la sensibilité a légèrement diminué à 91,8% (95% IC : 86,9 – 96,7%) alors que la spécificité a augmenté à 100%. Ceci est dû respectivement à l'augmentation des faux négatifs (n = 10) et à la disparition des faux positifs. A ce même seuil, la VPP est de 100% et la VPN est de 96,6% (95% IC : 93,8 – 98,3%). Pour les deux derniers seuils correspondant aux dilutions 1:400 et 1:800, on a observé une importante diminution de la sensibilité avec respectivement 75,4% (95% IC : 66,8 – 82,8%) et 51,6% (95% IC : 42,4 – 60,8%), et une constance de la spécificité à 100%. L'importante diminution de la sensibilité est due à l'augmentation des faux négatifs, 30 à la dilution 1:400 et 59 à la dilution 1:800. A la dilution 1:400, la VPP est de 100% et la VPN de 90,4% (95% IC : 86,5 – 93,4%). Enfin, à la dilution 1:800, la VPP est de 100% et la VPN de 82,7% (95% IC : 78,2 - 86,5%).

			Western Blot	
	Dilution	Résultats	+	-
Immunofluorescence Indirecte	1:100	+	115	15
		-	7	266
	1:200	+	112	0
		-	10	281
	1:400	+	92	0
		-	30	281
	1:800	+	63	0
		-	59	281

Tableau 7 : Résultats du WB et de l'IFI pour la totalité des sérums.

Globalement, le degré d'accord entre le test de référence (WB) et l'IFI est « quasiment parfait » pour les dilutions 1:100, 1:200 et 1:400, avec respectivement κ = 0,873 (95% IC : 0,822 – 0,925), κ = 0,940 (95% IC : 0,903 – 0,977) et κ = 0,811 (95% IC : 0,746 – 0,875). Il devient « moyen » à la dilution 1:800, avec κ = 0,598 (95% IC : 0,512 – 0,685). Le meilleur accord est atteint à la dilution 1:200 (tableau 8).

	Dilution	% Se (95% IC)	% Sp (95% IC)	% VPP (95% IC)	% VPN (95% IC)	κ (95% IC)
Total (n = 403)	1:100	94,3 (88,5 – 97,7)	94,7 (91,4 – 97,0)	88,5 (81,7 – 93,4)	97,4 (94,8 – 99,0)	0,873 (0,822 – 0,925)
	1:200	**91,8 (85,4– 96,0)**	**100**	**100**	**96,6 (93,8 – 98,3)**	**0,940 (0,903 – 0,977)**
	1:400	75,4 (66,8 – 82,8)	100	100	90,4 (86,5 – 93,4)	0,811 (0,746 – 0,875)
	1:800	51,6 (42,4 – 60,8)	100	100	82,7 (78,2 – 86,5)	0,598 (0,512 – 0,685)

Tableau 8 : Sensibilité, spécificité et accord de l'IFI par rapport au WB, en considérant la totalité des sérums testés.

Les résultats détaillés de l'IFI à la dilution-seuil choisie de 1:200 sont présentés ci-dessous (tableau 9) :

		Sérums « standards » (n = 232)		**Sérums « douteux »** (n = 110)	**Sérums séropositifs** (n = 57)		**Autres sérums** (n = 4)	
					à *N. caninum*	**à *T. gondii***		
		Positifs WB + ELISA + (n = 121)	**Négatifs** WB - ELISA – (n = 111)	WB - ELISA + (n = 110)	WB - (n = 32)	WB - (n = 25)	WB – (n = 3)	WB + (n = 1)
IFI 1:200	+	111	0	0	0	0	0	1
	-	10	111	110	32	25	3	0

Tableau 9 : Résultats de l'IFI à la dilution 1:200 des différents groupes de sérums étudiés.

Parmi les sérums « standards positifs », 111 sont positifs à l'IFI (seuil fixé à 1:200) soit quasiment 92%, contre 10 négatifs. La totalité des sérums « standards négatifs » sont négatifs à l'IFI. La totalité des sérums « douteux » sont également négatifs à l'IFI. La totalité des sérums séropositifs à *N. caninum* et à *T. gondii* sont négatifs à l'IFI, quelque soit la dilution (1:100, 1:200, 1:400, 1:800). Enfin, parmi les « autres sérums », les résultats de l'IFI coïncident avec ceux du WB, soit 3 négatifs et 1 positif.

IV. DISCUSSION

A. Matériels et méthodes

Dans cette étude, nous décrivons une technique d'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic de la besnoitiose à *B. besnoiti*. Le protocole proposé a été adapté de celui décrit par Shkap et al. (2002) et la souche de parasite a été isolée localement. La notion de souche n'a pas encore fait l'objet de travaux avancés concernant *B. besnoiti*. En particulier, les variations antigéniques n'ont pas encore été étudiées finement au sein de cette espèce parasitaire. Les tests sérologiques actuels utilisent des conjugués anti-IgG totaux et ne donnent pas accès ainsi à une discrimination des isolats en fonction de leur origine géographique suivant leur profil antigénique (Waap et al., 2011 ; Garcia-Lunar et al., 2012). Toutefois, deux publications soutiennent l'hypothèse de diversité à la fois génétique et de virulence concernant *B. besnoiti* suggérant la possibilité de souches différentes. Des variations de taille des microsatellites entre des isolats d'Italie (deux isolats identiques), d'Allemagne et d'Israël corrélée à la distance géographique entre ces isolats ont été mises en évidence (Madubata et al., 2012). En outre, en Afrique du Sud, la virulence semble différente entre une souche isolée à partir de bovins domestiques (virulence marquée) et celle isolée du Gnou bleu, *Connochaetes taurinusi*, de virulence moindre (Shkap et al., 1985). Cette souche « sauvage » a été exploitée dans le développement et la commercialisation d'un vaccin vivant atténué en Afrique du Sud. La concentration de tachyzoïtes permettant une lecture optimale des résultats sans perte de sensibilité, ni spécificité a été trouvé à 2.10^6 ml^{-1}. Cette concentration est la même que celle fixée par Shkap et al. (2002), mais inférieure à l'IFI développée par Schares et al. (2010) qui était de 5.10^6 ml^{-1}. L'optimisation de cette étape a permis d'améliorer la lisibilité des lames, et ainsi la fiabilité du test.

B. Résultats

Notre sérothèque a été classée en fonction des résultats préalablement obtenus par les tests WB et ELISA lors de la recherche sérologique d'anticorps anti-*B. besnoiti*, quatre groupes ont ainsi été formés. Les résultats obtenus à l'IFI (tableau 9) permettent de mettre en évidence trois points : (1) les résultats de la quasi-totalité des sérums (excepté 10 sérums) concordent avec ceux du WB ; (2) l'IFI a permis de confirmer la séropositivité des sérums évalués « douteux » ; (3) une excellente spécificité a été mise en évidence grâce à l'analyse de sérums séropositifs à *N. caninum* ou à *T. gondii*, tous séronégatifs à *B. besnoiti*.

En considérant la totalité des sérums analysés, le meilleur accord entre l'Immunofluorescence Indirecte et le Western Blot a été observé à la dilution 1:200 avec un coefficient de kappa (κ) égal à 0,940 (95% IC : 0,903 – 0,977), correspondant à une sensibilité de 91,8 (95% IC : 85,4 – 96,0%) et à une spécificité de 100%. Un seuil décisionnel correspondant à la dilution 1:200 est en accord avec les précédentes études utilisant l'IFI

comme méthode diagnostique (Shkap et al., 2002 ; Schares et al., 2010), et est similaire au seuil de 1:256 utilisé par Cortes et al. (2006). En utilisant un seuil décisionnel à une dilution plus faible, on augmente la sensibilité par diminution du nombre de faux négatifs, mais en contrepartie, on diminue la spécificité en augmentant le nombre de faux positifs. Le cas inverse est observé pour des dilutions plus importantes que 1:200 (*e.g.* 1:400 ou 1:800). Cependant, les seuls faux positifs (n = 15) observés durant l'étude (à la dilution 1:100) ne correspondent pas à des réactions croisées avec *N. caninum* ou *T. gondii*. En effet, comme on l'a vu précédemment les sérums séropositifs à *N. caninum* (n = 32) et à *T. gondii* (n = 25) sont tous séronégatifs à *B. besnoiti* après analyse par IFI (indépendamment de la dilution), ce qui était en accord parfait avec les résultats négatifs obtenus par WB. Aucune réaction croisée n'a donc été observée avec l'un ou l'autre de ces parasites proches. Ces résultats ne sont pas en accord avec de précédentes études qui ont montré l'existence de réactions croisées entre les anticorps de *N. caninum* et les antigènes de *B. besnoiti* aux dilutions en-dessous de 1:200 (*e.g.* 1:100) (Shkap et al., 2002 ; Schares et al., 2010) et l'existence de réactions croisées entre les anticorps de *T. gondii* et les antigènes de *B. besnoiti* (Goldman et Pipano, 1983). L'hypothèse de réactions croisées y compris avec les espèces du genre *Sarcocystis* aurait demandée à être vérifiée avec un nombre plus important de sérums. En effet, les infections à *Sarcocystis* spp. sont très répandues parmi les bovins (infections inapparentes) et sont le plus souvent des découvertes d'abattoir entrainant parfois des saisies totales. Ces parasites, de part leur proximité phylogénétique avec *Besnoitia* spp. sont susceptibles d'entrainer des réactions croisées, mais cette piste n'a pas encore pu être explorée. Il n'a pas été possible enfin de déterminer si les animaux cliniquement atteints étaient détectés par l'IFI du fait du mode de recrutement des échantillons sérologiques. Les résultats à la dilution 1:200 ont été facilement interprétables par microscopie optique à ultraviolets, les réactions positives ont présenté une fluorescence distincte et ininterrompue sur la périphérie des tachyzoïtes, et les réactions négatives ont présenté une absence nette de fluorescence sur la totalité ou par portion de la périphérie du parasite.

En considérant la totalité des sérums testés par ELISA (n = 342), le meilleur accord entre l'ELISA et le Western Blot a été observé à la DO de 20 avec un coefficient de kappa (κ) égal à 0,732 (95% IC : 0,658 – 0,805), correspondant à une sensibilité de 90,4% (95% IC : 83,8 – 94,9%) et à une spécificité de 85,3% (95% IC : 79,8 – 89,7%). Un seuil décisionnel correspondant à la DO de 20 n'est pas en accord avec le fabricant qui a fixé un seuil à une DO de 15 pour la version 2.0 utilisée. Par contre, la version 1.0 avait fixé un seuil à une DO de 20. En utilisant un seuil décisionnel à une DO inférieure (*e.g.* 10 et 15), on augmente la sensibilité par diminution du nombre de faux négatifs, qui est nul pour les DO de 10 et 15. Cependant, cela diminue la spécificité en augmentant le nombre de faux positifs.

Si l'on compare les techniques ELISA et IFI, respectivement à la DO de 20 et à la dilution 1:200 (tableau 10), on s'aperçoit que l'IFI présente une sensibilité légèrement supérieure, qui assure une VPN supérieure pour l'IFI. La spécificité de l'IFI est également bien meilleure et assure une VPP de 100%. Enfin, le degré d'accord entre les deux tests et le WB est « quasi parfait » pour l'IFI, et est « bon » pour l'ELISA. Cela montre que l'IFI possède de meilleures performances que l'ELISA. Cependant, il s'agit d'une technique plus coûteuse et plus fastidieuse.

	% Se (95% IC)	% Sp (95% IC)	% VPP (95% IC)	% VPN (95% IC)	κ (95% IC)
ELISA DO 20	90,4 (83,8 – 94,9)	85,3 (79,8 – 89,7)	77,9 (70,3 – 84,4)	93,9 (89,6 – 96,8)	0,732 (0,658 – 0,805)
IFI 1:200	**91,8 (85,4– 96,0)**	**100**	**100**	**96,6 (93,8 – 98,3)**	**0,940 (0,903 – 0,977)**

Tableau 10 : Comparaison des performances de l'IFI (1:200) et de l'ELISA (DO 20).

C. Conclusion partielle

La cinétique d'apparition des anticorps varie en fonction du test sérologique utilisé, et peut être à l'origine des différences de performances observées entre l'IFI, l'ELISA et le WB. Les tests sérologiques développés utilisent des conjugués anti-IgG totaux de bovins. Chez les bovins, la classe des immunoglobulines G se divise en sous-classes IgG1 et IgG2 dont les cinétiques d'apparition et profils de reconnaissance spécifique respectifs sont différents. Des infections expérimentales de veaux par des oocystes de *N. caninum* ont montré une apparition plus précoce des IgG1 par rapport aux IgG2 (De Marez et al., 1999). Malheureusement, aucun élément n'est actuellement disponible concernant les réponses IgG1 et IgG2 des bovins face à *B. besnoiti*. Cependant, la cinétique d'apparition des anticorps a déjà été évaluée. Par IFI, les anticorps sont détectés dès 10 jours post-injection intraveineuse et dès 22 jours post-injection sous-cutanée de parasites (Janitschke et al., 1984), aucune information complémentaire n'est disponible en revanche lors d'infestations naturelles. Par ELISA (PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0), ils sont détectés une semaine après l'injection expérimentale de tachyzoïtes et 15 jours après par WB (Fonclara, 2011). En conditions naturelles, ils ne sont pas détectés respectivement avant 3 et 4 semaines après la détection des premiers signes cliniques (Liénard et al., 2011) et persistent au moins pendant une période de deux ans à des niveaux qui fluctuent dans l'année mais toujours largement au-dessus des seuils de positivité (Alzieu et al., 2011). Avec le nouveau test APure-Bb ELISA développé par l'équipe allemande de Schares (2013), les anticorps sont détectés dans les mêmes délais que les tests sérologiques de référence soit 7 à 8 jours après le début des signes cliniques. Enfin, par RT-PCR, ils sont décelés dès 1 à 3 jours après le début du stade fébrile (Schares et al., 2013).

Par comparaison, la cinétique d'apparition des anticorps chez des chevaux atteints de babésiose équine à *Babesia caballi*, les anticorps anti-*Babesia caballi* sont détectés 7 à 11 jours après inoculation d'érythrocytes infectés à des poneys (Friedhoff et Soulé, 1996). Le test de fixation du complément décèle les anticorps dès 8 jours post-infection ; l'IFI dès 3 à 20 jours post-infection chez des chevaux infectés expérimentalement ; l'ELISA dès 2 jours post-infection (Brüning et al., 1996). L'ELISA permet une détection des anticorps anti-*Babesia caballi* plus précoce que l'IFI.

De telles comparaisons n'ont pu être effectuées ici faute de données suffisantes concernant l'historique des animaux recrutés pour cette étude. Enfin, les différences de sensibilités observées entre le WB et l'IFI peuvent être expliquées par les anticorps recherchés mis en jeu. Le WB repose sur des extraits totaux de tachyzoïtes, y compris les produits d'excrétion-sécrétion alors que l'IFI ne détecte que les anticorps dirigés contre les antigènes de surface du parasite. Ainsi, le WB détecte des sérums faussement négatifs en IFI. En effet,

les anticorps détectés par l'IFI pourraient avoir une cinétique d'apparition plus tardive que des anticorps dirigés contre les produits d'excrétion-sécrétion par exemple et être en quantité encore insuffisante au moment de l'analyse. Ainsi, un sérum détecté positif en WB pourrait être détecté positif au 1:100 mais négatif au 1:200 en IFI et devenir pleinement positif en IFI à la dilution seuil de 1:200 une à deux semaines plus tard.

L'Immunofluorescence indirecte mise au point dans cette étude a démontré la complexité de l'interprétation de la fluorescence, qui ne se fait en pratique que par un seul manipulateur. On souligne ici une des principales difficultés de ce test, qui demande à être réalisé toujours par la même personne car l'interprétation des résultats est très subjective, ce qui fait de l'IFI un test difficile à standardiser. Cependant, pour améliorer la fiabilité, à chaque lecture une lame présentant un sérum témoin positif et un témoin négatif était parcourue en premier. Par ailleurs, l'IFI est une méthode assez lourde à mettre en place, mais pouvant être utilisé en routine car les lames peuvent être préparées à l'avance et congelées à -80°C. En raison de son excellente spécificité, l'IFI peut être utilisée pour confirmer les résultats obtenus par d'autres tests (*i.e*. ELISA) ou résoudre les ambiguïtés lors de résultats discordants entre le WB et l'ELISA.

Un test sérologique prétendant être « Gold standard » doit être : (1) assez sensible pour détecter une infection durant la phase fébrile ou latente ; (2) spécifique pour différencier des parasites proches tels que *N. caninum* ou *T. gondii* ; (3) économique en matériel et en temps. L'IFI n'est pas loin d'être un test considéré en tant que tel au vu de sa sensibilité et de sa spécificité. Cependant, on ne peut pas le considérer comme un test économique lors d'analyses de routine.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de connaître les spécificités propres de l'IFI du laboratoire de Parasitologie de l'ENV-Toulouse, ce qui permet de disposer désormais d'un troisième test diagnostic afin de lever les incertitudes dans certaines situations où le WB et l'ELISA ne suffisent pas.

Les moyens diagnostiques se sont considérablement développés ces dernières années, avec le développement de nouvelles techniques telle que le test d'agglutination (Waap et al., 2011) et l'amélioration de techniques existantes : WB et ELISA (Schares et al., 2010, 2011, 2013). Actuellement, aucun test sérologique ne permet de détecter des animaux infectés au cours de la phase aiguë de la maladie. Ainsi, le développement de nouveaux tests comme une PCR permettant de détecter la présence d'ADN parasitaire dans le sang au cours des premiers stades de l'infection par *B. besnoiti* serait une des options possibles. La parasitémie a jusqu'ici été rapportée uniquement chez les animaux qui sont tout juste infectés (Bigalke, 1968). En effet, certains auteurs (Cortes et al, 2007a ; Schares et al, 2011) ont déjà mis au point des tests PCR et RT-PCR sur biopsies de peau de bovin qui permettent la détection de *B. besnoiti* même dans des échantillons qui ont été recueillis à partir d'animaux séropositifs mais asymptomatiques. Un kit commercial est déjà disponible en France (Adiavet™ Besnoitia, AES, Adiagene, Saint Brieuc, France). Fonclara (2011) a essayé lors de ses travaux de thèse de reproduire expérimentalement les différentes phases de la maladie sur deux génisses, avec ce kit sur des prélèvements sanguins durant la phase fébrile. Ses résultats n'ont pas été concluants, et elle précise qu'il serait souhaitable de refaire les expérimentations sur des cas d'infection naturelle car le modèle d'infection expérimentale n'est pas maîtrisé. Aussi, le diagnostic précoce (*i.e.* dans la première phase clinique) de la maladie ne repose encore aujourd'hui que sur l'expérience du clinicien vis-à-vis de la besnoitiose bovine. Avec les outils actuels, la confirmation sérologique ne survient au plus tôt que 7 à 8 jours après l'épisode fébrile (Schares et al., 2013).

À l'heure actuelle, l'enjeu majeur est de protéger les élevages et les régions indemnes. La stratégie globale est fondée sur l'analyse du danger et du risque. Le parasite *Besnoitia besnoiti* est identifié en tant que danger majeur. En ce qui concerne le risque, il comprend différents éléments : (1) la distance géographique entre un élevage (ou une région) infecté(e) et un élevage (ou une région) indemne ; (2) l'achat d'un bovin potentiellement infecté dont le statut de l'élevage d'origine n'est pas connu (cas le plus fréquent) ; (3) le système d'élevage où on peut observer un mélange de bovins provenant de différents cheptels (cas de la transhumance). Au niveau national, cette stratégie globale de contrôle en cours d'élaboration vise à harmoniser les connaissances cliniques, épidémiologiques et la conduite diagnostique, afin d'améliorer les pratiques d'élevage. Cela passe entre autre par un contrôle sérologique individuel lors d'achat de bovin provenant de régions infectées.

Ainsi, la standardisation et la validation des tests sérologiques est la première étape vers le contrôle de la maladie, car cela permettrait d'obtenir des résultats comparables dans des pays différents. Ainsi, idéalement, chaque pays pourrait adopter des procédures de diagnostic communes pour le contrôle de la maladie.

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE

Université Paul Sabatier TOULOUSE III

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, ***LIENARD Emmanuel***, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de ***François LENFANT*** intitulée « ***Mise au point d'une technique de diagnostic par immunofluorescence indirecte de la besnoitiose bovine à Besnoitia besnoiti»*** et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 7 octobre 2013
Docteur Emmanuel LIENARD
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

E. Lienard

Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON

Vu :
Le Président du jury :
Professeur Alexis VALENTIN

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation
Le vice-Président du CEVU
Arnaud LE PADELLEC

M. LENFANT François
a été admis(e) sur concours en : 2008
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012
a validé son année d'approfondissement le : 27/06/2013
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Ecole nationale Vétérinaire- 23, chemin des capelles - 31076 Toulouse Cedex 3 - France

Université de Toulouse

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agosti M, Belloni A, Morini M, Vacirca G (1994). Segnalazione di unfocolaio di Besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis Vet,* 15 : 5–6.

Alvarez-García G, Frey CF, Mora LM, et Schares G (2013). A Century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends Parasitol,* 29 : 407-415.

Alzieu JP (2000). La besnoitiose ou anasarque des bovins : une parasitose en extension à bien diagnostiquer. *Recueil conférences Journées nationales GTV, Dijon* : 343-345.

Alzieu JP, Cortes H, Gottstein B, Jacquiet P, Dorchies P, Schelcher F, L'hostis M. (2007). La besnoitiose bovine : actualités épidémiologiques et diagnostiques. *Bull GTV – Hors-série parasitisme des bovins,* 41-49.

Alzieu JP, Dorchies P, Schelcher F et Gottstein B (2007a). L'extension de la besnoitiose bovine en France : une problématique complexe. *Recueil conférences Journées nationales GTV, Nantes* : 837-845.

Alzieu JP, Dorchies P, Schelcher F et Gottstein B (2007b). L'extension de la besnoitiose bovine en France. *Point Vétérinaire,* 276 : 37-43.

Alzieu JP, Jacquiet P (2009). Actualités sur la transmission et le diagnostic de la besnoitiose bovine. *Point Vétérinaire,* 301 : 16-19.

Alzieu JP, Jacquiet P (2010). La besnoitiose bovine : une émergence avérée en France et en Europe: moyens de diagnostic et de contrôle. *Recueil XXème Rencontres GTV, Rhône-Alpes* : 1-13.

Alzieu JP, Jacquiet P, Liénard E, Grisez C, Prevot F, Malavieille R, Desclaux X, Nussbaum S, Bergeaud JP, Franc M, Schelcher F, Corboz N, Bastien F, Guerrier-Châtelet MC, Gavet L, Schneider V, Boulon C (2011). Réémergence de la besnoitiose bovine : démarche diagnostique et possibilités de contrôle. *Bull GTV,* 58 : 71-86.

Barros ATM, and Foil LD (2007). The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. *Vet Parasitol,* 144 : 380-384.

Basso W, Schares G, Gollnick NS, Rütten M, et Deplazes P (2011). Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* - experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Vet Parasitol,* 178 : 223-234.

Basson PA, McCully RM, et Bigalke RD (1970). Observations on the Pathogenesis of Bovine and Antelope Strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) Infection in Cattle and Rabbits. *Onderstepoort J Vet Res,* 37 : 105-126.

Berhault G (2008). *La Besnoitiose à Besnoitia besnoiti : étude de réservoirs sauvages potentiels dans un foyer en Maine et Loire.* Thèse doctorat vétérinaire, Toulouse, 96p.

Besnoit C et Robin V (1912). Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Revue Vétérinaire,* 37 : 649-663.

Bigalke RD (1960). Preliminary observation on the mechanical transmission of cyst organisms of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from a chronically infected bull to rabbits by *Glossina brevipalpis*. *J S Afr Vet Assoc*, 31 : 37-44.

Bigalke RD (1967). The Artificial Transmission of *Besnoitia Besnoiti* (Marotel, 1912) from chronically infected to susceptible cattle and rabbits. *Onderstepoort J Vet Res,* 34 : 303-316.

Bigalke RD (1968). New Concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. *Onderstepoort J Vet Res,* 35 : 133-137.

Bigalke RD (1981). Besnoitiosis and globidiosis. *Curr Top Vet Med Anim Sci,* 6 : 429-442.

Brüning A (1996). Equine Piroplasmosis an Update on Diagnosis, Treatment and Prevention. *Brit Vet J,* 152 : 139–151.

Cortes HC, Leitão A, Vidal R, Vila-Viçosa MJ, Ferreira ML, Caeiro V, Hjerpe CA (2005). Besnoitiosis in bulls in Portugal. *Vet Rec* 157: 262-264.

Cortes HC, Nunes S, Reis Y, Staubli D, Vidal R, Sager H, Leitão A, Gottstein B (2006a). Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western Blot. *Vet Parasitol,* 141 : 216-225.

Cortes HC, Reis Y, Waap H, Vidal R, Soares H, Marques I, Pereira da Fonseca I, Fazendeiro I, Ferreira ML, Caeiro V, Shkap V, Hemphill A, Leitão A (2006b). Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet Parasitol,* 141 : 226-233.

Cortes HC, Reis Y, Gottstein B, Hemphill A, Leitão A, Müller N. (2007a). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet Parasitol,* 146 : 352-356.

Cortes HC, Mueller N, Esposito M, Leitão A, Naguleswaran A, et Hemphill A (2007b). In vitro efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in vero cells. *Parasitol,* 134 : 975-985.

Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MA, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LF (2008). Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol,* 38 : 157-159.

Cuillé J, Chelle PL, Berlureau F (1936). Transmission expérimentale de la maladie dénommée « Sarcosporidiose cutanée » du bœuf (Besnoit et Robin) et déterminée par « *Globidium besnoiti* ». *Acad Med,* 161-163.

De Marez T, Liddell S, Dubey J P, Jenkins M C, and Gasbarre L (1999). Oral Infection of Calves with Neospora Caninum Oocysts from Dogs: Humoral and Cellular Immune Responses. *Int J Parasitol,* 29 : 1647–1657.

Diesing L, Heydorn AO, Matuschka FR, Bauer C, Pipano E, de Waal DT, Potgieter FT (1988). *Besnoitia Besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. *Parasitol Res,* 75 : 114-117.

Doyle MS, Swope BN, Hogsette JA, Burkhalter KL, Savage HM, Nasci RS (2011). Vector competence of the stable fly (Diptera: Muscidae) for West Nile Virus. *J Med Entomol,* 48 : 656-668

Dubey JP (2002). A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol,* 106 : 121-153.

Dubey JP, Shkap V, Pipano E, Fish L, Fritz DL (2003a). Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoïtes. *J Eukaryot Microbiol,* 50 : 240-244.

Dubey JP, Sreekumar C, Lindsay DS, Hill D, Rosenthal BM, Venturini L, Venturini MC, Greiner EC (2003b). *Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits. *Parasitol,* 126 : 526-539.

Dubey JP, Sreekumar C, Rosenthal BM, Lindsay DS, Grisard EC, Vitor RW (2003c). Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodoni* n.sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the rodent Akodon montensis in Brazil. *Parassitologia,* 45 : 61-70.

Dubey JP, Sreekumar C, Rosenthal BM, Vianna MC, Nylund M, Nikander S, Oksanen A (2004). Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*). *Int J Parasitol,* 34 : 1273-1287.

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev,* 20 : 323-367.

Dubey J P, and Yabsley M J (2010). *Besnoitia Neotomofelis* N. Sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the Southern Plains Woodrat (*Neotoma Micropus*). *Parasitol,* 137 : 1731-1747.

Ellis J T, Holmdahl O J, Ryce C, Njenga J M, Harper P A, et Morrison D A (2000). Molecular phylogeny of Besnoitia and the genetic relationships among Besnoitia of cattle, wildebeest and goats. *Protist,* 151 : 329-336.

Elphick J (2007). The Atlas of Bird Migration. *Struik Publish,* 176.

European Food Safety Authority (2010). Bovine besnoitiosis : an emerging disease in Europe. *EFSA Journal,* 8 : 1499.

Euzeby J (1987). Protozoologie médicale compare. Les protozooses des animaux et leurs relations avec les protozooses de l'Homme (avec études des arthorpodes hématophages

vecteurs de protozoaires). Volume II. Myxozoa – Microspora – Acetospora – Apicomplexa 1. Coccidioses (sensus lato). *Fondation Marcel Mérieux*.

Everitt BS (1989). Statistical methods for medical investigations. *Oxford Univ Press,* London, United Kingdom.

Fernández-García A, Risco-Castillo V, Pedraza-Díaz S, Aguado-Martínez A, Alvarez-García G, Gómez-Bautista M, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM (2009b). First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *J Parasitol,* 95 : 474-476.

Fernández-García A, Alvarez-García G, Risco-Castillo V, Aguado-Martínez A, Marcén J M, Rojo-Montejo S, Castillo J A, and Ortega-Mora L M (2010). Development and Use of an Indirect ELISA in an Outbreak of Bovine Besnoitiosis in Spain. *Vet Rec* 166 : 818–822.

Ferrié J (1984). *La besnoitiose bovine, revue bibliographique et observations personnelles*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse.

Fonclara E (2011). *Infection expérimentale de génisses par Besnoitia besnoiti*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 129p.

Franc M, Cadiergues MC (1999). La besnoitiose bovine : attitude diagnostique et thérapeutique. *Bulletin Groupement Technique Vétérinaire,* 2 : 119-124.

Frenkel JK (1977). *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: with a reclassification of other cyst-forming isosporoid coccidia. *J Parasitol,* 63 : 611-628.

Frenkel JK and Smith DD (2003). Determination of the genera of cyst-forming coccidian. *Parasitol Res,* 91 : 384-389.

Freudiger I (2008). *La besnoitiose bovine : étude épidémiologique de l'épizootie des Alpes-de-Haute-Provence et des Hautes-Alpes*. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 84p.

Friedhoff K T and Soulé C (1996). An Account on Equine Babesioses. *Rev Sci Tech Oie*, 15 : 1191–1201.

Fulton JD and Turk JL. (1959). Direct agglutination test for *Toxoplasma gondii*. *Lancet,* 1068-1069.

Furuta PI, Mineo TW, Carrasco AO, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ (2007). *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitol* 134 : 1931-1939.

García-Lunar P, Ortega-Mora L M, Schares G, Gollnick N S, Jacquiet P, Grisez C, Prevot F, Frey C F, Gottstein B, et Alvarez-García G (2013). An Inter-laboratory Comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines. *Transboundary Emer Dis,* 60 : 59-68.

Genest C (2008). *La besnoitiose bovine à Besnoitia besnoiti : enquête sérologique et écologique dans un foyer d'émergence du Maine et Loire*. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes, 133p.

Goldman M and Pipano E (1983). Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Trop Anim Health Pro,* 15 : 32-38.

Gollnick NS, Gentile A, Schares G (2010). Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Vet Rec,* 166 : 599.

Gondim LS, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MS, Santos SL, Mota RA, Vilela SM, Gondim LF (2010). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. *Vet Parasitol,* 168 : 121-124.

Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thür B, Bruckner L, Müller N, Kaufmann H, Waldvogel A (1999). Molecular and immunodiagnostic studies of bovine neosporosis in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 141 : 59-68.

Gourreau JM. Les photosensibilisations. *Maladies des bovins 3è édition*, 380-385.

Irigoien M, Del Cacho E, Gallego M, López-Bernad F, Quílez J, Sánchez-Acedo C (2000). Immunohistochemical study of the cyst of Besnoitia besnoiti. *Vet Parasitol,* 91 : 1-6.

Jacquiet P, Boucher C, Lienard E et coll. (2009). La besnoitiose bovine : enquêtes sérologiques dans le sud-ouest de la France. *Recueil conférences Journées nationales GTV, Nantes* : 1213-1217.

Jacquiet P, Liénard E, and Franc M (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Vet Parasitol,* 174 : 30-36.

Janitschke K, De Vos AJ, Bigalke RD (1984). Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. *Onderstepoort J Vet Res,* 51 : 239-243.

Jeuland S (2010). *Séroprévalence de la besnoitiose bovine dans deux foyers du Maine et Loire.* Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes, 129p.

Landis JR, Koch GG (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33 : 159-174.

Lee HS, Bak UB, Moon MH, Shin JU (1970). Studies on bovine besnoitiosis in Korea: II. A survey on incidence in the enzootic region Kisaengch'unghak chapchi. *Korean J Parasitol*, 8: 76-80.

Legrand P (2003). *La besnoitiose bovine en Ariège*. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 87p.

Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP (2006). Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci, USA,* 103 : 11423-11428.

Lesser M, Braun U, Deplazes P, Gottstein B, Hilbe M, et Basso W (2012). [First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland]. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 154 : 469-474.

Liénard E, Salem A, Grisez C, Prévot F, Bergeaud JP, Franc M, Gottstein B, Alzieu JP, Lagalisse Y, Jacquiet P (2011). A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France." *Vet Parasitol,* 177 : 20-27.

Liénard E, Salem A, Jacquiet P, Grisez C, Prévot F, Blanchard B, Bouhsira E, et Franc M (2012). Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Parasitol Res,* 112 : 479-486.

Lindsay DS and Dubey JP (2001). Direct agglutination test for the detection of antibodies to Sarcocystis neurona in experimentally infected animals. *Vet Parasitol,* 95 : 179-186.

Mackinnon A (2000). A spreadsheet for the calculation of comprehensive statistics for the assessment of diagnostic tests and inter-rater agreement. *Comput Biol Med,* 30 : 127-134.

Madubata C, Dunams-Morel DB, Elkin B, Oksanen A, Rosenthal BM (2012). Evidence for a recent population bottleneck in an Apicomplexan parasite of caribou and reindeer, *Besnoitia tarandi*. *Infect Genet Evol,* 12 : 1605-1613.

Mehlhorn H, Klimpel S, Schein E, Heydorn AO, Al-Quraishy S, Selmair J (2009). Another african disease in central Europa: besnoitiosis of cattle. I. Light and electron microscopical study. *Parasitol Res,* 104 : 861-868.

Mullen GR, Durden LA (2009). Medical and veterinary entomology. *Acad Press, San Diego,* 637p.

Mutinelli F, Schiavon E, Ceglie L, Fasolato M, Natale A, Rampin F, and Carminato A (2011). Bovine Besnoitiosis in Imported Cattle in Italy. *Vet Parasitol,* 178 : 198.

Olias P, Schade B, Mehlhorn H (2011). Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of Besnoitia species (protozoa: Sarcocystidae). *Infect Genet Evol : J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis,* 11 : 1564-1576.

Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC (1998). A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol,* 5 : 467-473.

Peteshev VM, Galuzo IG, Polomoshnov AP (1974). [Cats – definitive hosts of Besnoitia (*Besnoitia besnoiti*)]. *Izvest Akad Nauk Kazakh Ser Biol,* 1 : 33-38.

Pipano E (1997). Vaccines against hemoparasitic diseases in Israel with special reference to quality assurance. *Trop Anim Health Pro,* 29 : 86S-90S.

Pols JW (**1954).** The artificial transmission of *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) to cats and rabbits. *J S Afr Vet Med Assoc*, 25 : 37-44.

Pols JW (1960). Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. *Onderstepoort J Vet Res*, 28 : 265-356.

Romand S, Thulliez P, Dubey JP (1997). Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res*, 80 : 50-53.

Rommel M (1975). New knowledge on the biology of Coccidia, Toxoplasma, Sarcosporidia and Besnoitia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 88 : 112-117.

Sannusi A (1991). A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. *Vet Parasitol*, 39 : 185-188.

Schares G, Basso W, Majzoub M, Cortes HC, Rostaher A, Selmair J, Hermanns W, Conraths FJ, Gollnick NS (2009). First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Vet Parasitol*, 163 : 315-322.

Schares G, Basso W, Majzoub M, Rostaher A, Scharr J C, Langenmayer M C, Selmair J, et al. (2010). Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. *Vet Parasitol*, 171 : 32-40.

Schares G, Basso W, Majzoub M, Rostaher A, Scharr JC, Langenmayer MC, Selmair J, Dubey JP, Cortes HC, Conraths FJ, Haupt T, Pürro M, Raeber A, Buholzer P, Gollnick NS (2011). Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol*, 175 : 52-59.

Schares G, Langenmayer M C, Scharr J C, Minke L, Maksimov P, Maksimov A, Schares S, et al. (2013). Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *Int J Parasitol*, 43 : 143-154.

Schofield S and Torr S J (2002). A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Med Vet Entomol*, 16 : 177-185.

Shkap V, Ungar-Waron H, Pipano E, et Greenblatt C (1984). Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Trop Anim Health Pro*, 16 : 233-238.

Shkap V, De Waal DT, Potgieter FT (1985). Chemotherapy of experimental *Besnoitia besnoiti* infection in rabbits. *Onderstepoort J Vet Res*, 52 : 289.

Shkap V, Pipano E, Marcus S, Krigel Y (**1994).** Bovine besnoitiosis : transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort J Vet Res*, 61 : 273-275.

Shkap V, Reske A, Pipano E, Fish L, Baszler T (2002). Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Vet Parasitol*, 106 : 35-43.

Smith D D and Frenkel J K (1977). *Besnoitia darlingi* (protozoa: toxoplasmatinae) : cyclic transmission by cats. *J Parasitol,* 63 : 1066-1071.

Staubli D (2006). *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. *Parasitol Res,* 99 : 648-658.

Tenter AM and Johnson AM (1997). Phylogeny of the tissue cyst-forming coccidia. *Adv Parasit,* 39 : 69-139.

Tenter Astrid M, Barta J R, Beveridge I, Duszynski D W, Mehlhorn H, Morrison D A, Andrew Thompson R C, et Conrad P A (2002). The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int J Parasitol,* 32 : 595-616.

Waap H, Cardoso R, Marcelino E, Malta J, Cortes H, et Leitão A (2011). A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Vet Parasitol,* 178 : 217-222.

Wang XS and Liu WD (1987). Preparation of antigen from *Besnoitia besnoiti* (bovine) and study on diagnosis of bovine besnoitiosis using the indirect haemagglutination test. *Acta Vet Zootech Sin,* 18 : 55-61.

ANNEXES

ANNEXE 1

PROTOCOLE : DU KYSTE A BRADYZOITES AUX TACHYZOITES.

J0 **Du prélèvement de peau jusqu'à la mise en culture des bradyzoïtes**

① Prélèvement d'un morceau de peau kystique - transporté dans du PBS péni / strepto (500ml + 12ml +12ml).

② Disséquer le prélèvement dans boite de Pétrie avec scalpel.

③ Filtrer sur BD Falcon 40 µm.

④ Passer sur Colonne de Purification :

- Préparer un tampon d'élution (PBS) et laver les colonnes avec 15 ml de PBS. Attention : jeter ces premiers 15 ml la suspension de parasites est diluée avec 15 ml de PBS afin d'avoir 16 ml de volume final.

- Distribuer 2 ml par colonne.

- Laisser la suspension parasitaire pénétrer dans la colonne (on peut la suivre par la couleur rosée du milieu).

- Eluer les parasites avec 15 ml de PBS.

- Quand le volume au fond du Falcon est de 15 ml, stopper l'élution, les parasites sont alors élués et se retrouvent au fond du Falcon de 50 ml.

- Regrouper les différents volumes de 15 ml dans 3 Falcons de 50 ml.

⑤ Centrifuger à 1200 rpm, 10 minutes à 4°C.

⑥ Retirer le surnageant, reprendre les parasites dans 1 ml de PBS. Vérifier la présence des bradyzoïtes.

⑦ Recommencer l'élution autant de fois que nécessaire pour obtenir les Bradyzoïtes.

⑧ Comptage à la cellule de Malassez après avoir dilué au 1 :100.

Déposer les Bradyzoïtes sur Cellules VERO préparées la veille

J2 **Changement du milieu BB**

J6 **Changement du milieu BB**

J8 **Changement du milieu BB**

J9 **Passage sur nouvelles cellules VERO** (préparées la veille) :

① Après avoir vérifié qu'il n'y ait pas de BB libres, vider le surnageant.

② Additionner 8 ml de milieu simple et scrapper avec le racloir.

③ Récupérer les 8 ml de scrapping dans Falcon 15 et Compléter à 13 ml (cela lave mieux).

④ Centrifuger à 1200 rpm, 10 minutes à 4°C.

⑤ Jeter le Surnageant. Re-suspendre le culot dans 3 ml de milieu BB et tout déposer dans la flasque de cellules VERO préparées la veille et contenant 27 ml de milieu BB.

J13 (09/02) Changement du milieu BB.

J16 (12/02) Changement du milieu BB.

J17 (13/02) Passage sur nouvelle flasque de cellules VERO préparée la veille.

J20 (16/02) **Visualisation des tachyzoïtes.**

ANNEXE 2

PROTOCOLE : CULTURE DES CELLULES VERO ET MISE EN CULTURE DES TACHYZOITES DE B. BESNOITI.

1 Objet et domaine d'application

Les cellules VERO sont des cellules rénales de singe

2 Documents de référence

Fiche de description ATCC (ref : CCL-23)

3 Principe de la méthode

Cette lignée est constituée de cellules adhérentes et donc soumise à l'action de la trypsine. La croissance cellulaire est rapide et la confluence est atteinte en 48 à 72 h.

Les cellules VERO sont repiquées par trypsinisation puis cultivées en étuve à 37°C et 5% de CO2, en MEM complet, constitué de DMEM 1X, d'acides aminés non essentiels 1X, de pénicilline et de streptomycine , Nystatine et SVF décomplémenté (56°C pendant 30 minutes).

4 Matériel nécessaire

- Flacon de culture cellulaire (25, 75 ou 175 cm2)
- Plaque de culture cellulaire (P6, P24 ou P96)
- Pipettes stériles de 25 ml, 10 ml, 5 ml, et 1 ml
- Tubes coniques Falcon de 50 ml
- Multipette
- Pipet-aid.

5 Réactifs

- Trypsine EDTA – Invitrogen Ref : 25200 056
- DMEM glutamax 1X : Invitrogen Ref : 31965 023
- Acides Aminés Non Essentiels 100X - Invitrogen Ref : 11140-035
- Pénicilline et Streptomycine 10000 U/ml et 10000 □g/ml- Invitrogen Ref : 15140 122
- Sérum de Veau Foetal (SVF) testé pour la culture cellulaire et indemne de mycoplasme et de BVDV -Eurobio ref : CVFSVF00 01
- Nystatine - SIGMA Ref : N 1638 100ml
- PBS- Invitrogen Ref : 18912-014

6 Milieu complet pour la culture de cellules VERO (Milieu VERO)

- MEM 1X	435 ml
- AANE 100X	5 ml
- Nystatine	5 ml
- Pénicilline et Streptomycine	5 ml
- 10% de sérum de veau fœtal désactivé	50 ml

7 Mode opératoire

Tous les produits (milieu complet + trypsine + milieu MEM seul) doivent être à température ambiante pour manipuler ; sortis du frigo, laisser minimum 1 H sur la paillasse.

7-a TRYPSINATION et MISE EN CULTURE EN FLASK

Passage d'un tapis confluent :

- Eliminer le surnageant
- Rincer 1 fois avec du PBS stérile (pour éliminer le SVF qui inhiberait la Trypsine)
- Déposer de la trypsine 1X (2 ml pour une F75, 3 ml pour une F175) et mettre la boite de culture à l'étuve 37°C , 5 minutes maximum.
- Arrêt de l'action de la trypsine avec du milieu complet pour volume final de 10ml
- Ensemencer dans F75: 2 ml pour 20 ml de milieu complet
- Noter sur la flask : Cellules VERO+ le N° de Passage + la date
- Incuber à 37°C sous 5% de CO2.

Ne pas Manipuler les Flasks dans les 4 heures qui suivent, laisser les cellules se fixer.

7-b PASSAGE DE *B. BESNOITI*

Additionner 2 à 3 ml de *B. besnoiti (Bb)* du surnageant de la Flask de culture : Cellule VERO + Bb.

Puis en (7) noter sur la flask : VERO+ Bb et aussi le N° de Passage + la date.

Ne SURTOUT pas Manipuler les Flasks dans les 4 H qui suivent, laisser les cellules se fixer et les Bb rentrer dans les cellules.

ANNEXE 3

Mode d'emploi : PrioCHECK® Besnoitia Ab

Draft

PrioCHECK® Besnoitia Ab

ELISA for *in vitro* detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in bovine serum samples

5 plate kit for 450 samples
©Prionics AG

Version 0.9e

Package Insert

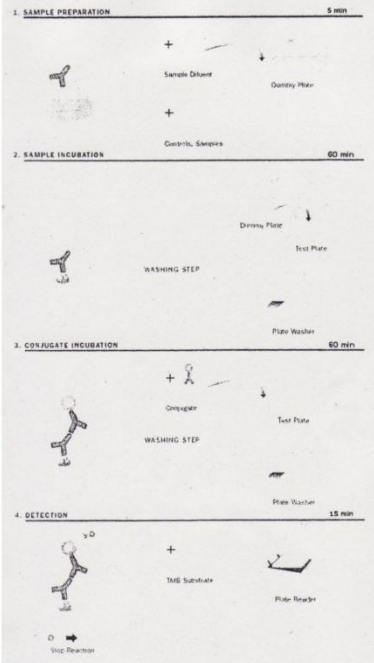
For *in-vitro* veterinary diagnostic use only
Store at 5±3°C
Product No.: 7610490

Introduction

Bovine besnoitiosis is caused by infection with *Besnoitia besnoiti*, a protozoan parasite which belongs to the family Sarcocystidae. All cattle breeds, independent of sex and age, can be infected. Affected animals undergo different stages of disease including skin thickening, swelling, hair loss and skin necrosis, bulls can get infertile. In severe cases the disease can lead to death of the animal. Subclinically infected animals play an important role in the epidemiology of the disease. The parasite might be transmitted to other animals by insect vectors, namely biting flies like Tabanus and Stomoxys but probably also mosquitoes can function as a vector. The cysts (200 -600 µm in diameter) are found in subcutaneous tissue, fascia and mucosa of the infected animals and can survive for over ten years in the host.
Besnoitia besnoiti can cause substantial economic losses and therefore it is crucial to identify infected animals.

The PrioCHECK® Besnoitia Ab is an ELISA which can be used for the detection of antibodies against this parasite in infected cattle. The PrioCHECK® Besnoitia Ab is an excellent tool to screen cattle herds in order to identify infected animals. Identifying infected animals is important to avoid spreading of the disease and also to avoid introducing infected animals into a new herd.

Test Principle



The diagnostic assay for the detection of antibodies directed against *Besnoitia besnoiti* in bovine serum is based on ELISA technology. Besnoitia antigen is coated on the ELISA plate. Serum samples are incubated on the plate. A peroxidase (POD) labeled anti-pig antibody is used for the detection of antibodies bound to the antigen. Color development using TMB substrate measured optically at a wavelength of 450 nm shows the presence of antibodies directed against *Besnoitia besnoiti*. The PrioCHECK® Besnoitia Ab follows a four step protocol, consisting of Sample Preparation, Sample Incubation, Conjugate Incubation, and Detection. One plate with 90 prepared samples can be analyzed within 150 minutes.

Kit Components

Shelf life of all un-opened components is 1 year after manufacturing. See kit label for actual expiry date. The shelf life of diluted, opened or reconstituted components is noted below, where appropriate. Chemical hazard data are available in section "Safety Regulations and R&S Statements" (Appendix IV).

Component 1
Test Plate
(Strip Plate) Five Test Plates are delivered in vacuum bags containing a desiccant bag.

Component 2
Sample Diluent (Ready-to-use)
Three bottles containing 60 ml of Sample Diluent. The Sample Diluent is used to dilute the samples.
Color of solution: yellow

Component 3
Washing Fluid (20x)
(20x concentrated, dilute before use). Two bottles containing 60 ml Washing Fluid (20x).
Prepare Washing Fluid working solution by mixing 1 part Washing Fluid (20x) with 19 parts demineralized water or water of equal quality and 0.2 parts of Washing Fluid Additive (equals 1%). Mix until a clear solution is obtained.
Remark: If the Washing Fluid (20x) shows a precipitate, warm the bottle up in a 30°C water bath until the precipitate is completely redissolved.
See Appendix II
Stability of Wash Fluid working solution: 2 weeks at 22±3°C.

Component 4
Washing Fluid Additive
One bottle contains 30 ml Washing Fluid Additive. 1% Washing Fluid Additive has to be added to the diluted washing fluid. Mix until a clear solution is obtained.
Remark: viscous liquid.
See Appendix II

Component 5
Conjugate Diluent (Ready-to-use)
One bottle contains 60 ml Conjugate Diluent.
The Conjugate Diluent is used to dilute the Conjugate.
Color of solution: red

Component 6
Conjugate (30x)
(30x concentrated, dilute before use). One bottle containing 2 ml of Conjugate. Prepare 1x Conjugate by mixing 1 part of Conjugate with 29 parts of Conjugate Diluent. Dilute the amount of Conjugate necessary to run the test, just prior to use.
See Appendix II

Component 7
Chromogen (TMB) Substrate (Ready-to-use)
One bottle containing 60 ml of Chromogen (TMB) substrate. The Chromogen (TMB) substrate is the substrate for the color reaction.

Component 8
Stop Solution (Ready-to-use)
One bottle containing 60 ml Stop Solution. The Stop Solution is used to stop the color development.

Component 9
Demineralized Water
One vial containing 10 ml Demineralized Water. Demineralized Water is used to reconstitute the lyophilized control samples.

Component 10
Positive Control (Lyophilized)
One vial containing the lyophilized Positive Control. The Positive Control is reconstituted by adding 150 µl of Demineralized Water (supplied with the kit). Mix by vortexing thoroughly and inverting the vial several times.
Store at -20 to -80°C after reconstitution. Can be aliquoted or may be frees-thawed up to 5 times.

Component 11
Weak Positive Control (Lyophilized)
One vial containing lyophilized Weak Positive Control. The Weak Positive Control is reconstituted by adding 150 µl of Demineralized Water (supplied with the kit). Mix by vortexing thoroughly and inverting the vial several times.
Store at -20 to -80°C after reconstitution. Can be aliquoted or may be frees-thawed up to 5 times.

Component 12
Negative Control (Lyophilized)
One vial containing lyophilized Negative Control. The Negative Control Sample is reconstituted by adding 150 µl of Demineralized Water (supplied with the kit). Mix by vortexing thoroughly and inverting the vial several times.
Store at -20 to -80°C after reconstitution. Can be aliquoted or may be frees-thawed up to 5 times.

Additional Kit Contents:

Package Insert

Additional Material Required

General:
Laboratory equipment according to national safety regulations

- Demineralized water or water of equal quality must be used
- Dummy plate, used for sample dilution (e.g. clear colorless round bottom 96 well plate) or equivalent
- Single channel pipette (10 – 100 µl)
- Single channel pipette (20 -200 µl)
- Multichannel pipette (5 – 50 µl)
- Multichannel pipette (50 – 300 µl)

- Pipette tips (as recommended by pipette manufacturer)
- Solution reservoirs
- Vortex

Sample preparation:
- Appropriate blood collection Tubes for serum collection.

Analysis of Results:
Plate Reader, e.g. Tecan Sunrise or equivalent.
The reader has to have an appropriate filter set to read the plates at 450 nm.

Optional:
Plate washer, e.g. Tecan EIA Tray Washer or equivalent.

Test Procedure

Precautions
National guidelines for working with animal samples must be strictly followed. The PrioCHECK® Besnoitia Ab must be performed in laboratories suited for this purpose.
Samples should be considered as potentially infectious and all items which contact the samples as potentially contaminated.

Chemical hazard data are available in section "Safety Regulations and R&S Statements" (Appendix IV).

Notes
To achieve optimal results with the PrioCHECK® Besnoitia Ab, the following aspects must be considered:

- **The Test Procedure protocol must be strictly followed.**
- Pipette tips have to be changed for every pipetting step.
- Separate solution reservoirs must be used for each reagent.
- Kit components must not be used after their expiry date or if changes in their appearance are observed.
- Kit components of different kit lot numbers must not be used together.
- Demineralized water or equal must be used for the test.

SAMPLE PREPARATION

- Serum can be obtained using standard methods.

SAMPLE DILUTION:

Preparatory Steps
- Reconstitute the control sample by adding 150 µl of Demineralized Water (delivered with the kit). Mix by vortexing thoroughly and inverting the vial several times or use already reconstituted control samples that have been stored at -20 to -80°C.

Sample dilution
- Use a Dummy Plate or equivalent for first sample dilution.
- Add 10 µl of Positive Control to wells A1 and B1 of the Dummy Plate.
- Add 10 µl of Weak Positive Control to wells C1 and D1 of the Dummy Plate.
- Add 10 µl of Negative Control to wells E1 and F1 of the Dummy Plate.
- Add 10 µl of serum samples to the remaining wells of the Dummy Plate.
- Add 190 µl of Sample Diluent to each well of the Dummy Plate and mix by pipetting up and down 5 times.
- Add 90 µl of Sample Diluent to each well of the Test Plate.
- Transfer 10 µl of the diluted samples and controls from the Dummy Plate to the Test Plate and mix by pipetting up and down 5 times.

SAMPLE INCUBATION

- Incubate the samples on the Test Plate for 60±1 minutes at room temperature (22°C±3°C).
- Wash the Test Plate four times with 300 µl 1x Wash Fluid working solution (see Appendix II).
  Remark: If you use a plate washer, be sure that no needles are clogged.

CONJUGATE INCUBATION

Preparatory Steps
- Dilute the needed amount of Conjugate (30x) 30 fold in Conjugate Diluent (e.g add 400 µl Conjugate to 11.6 ml Conjugate Diluent for one full plate; see Appendix II).

Conjugate incubation
- Add 100 µl of the diluted Conjugate to each well of the Test Plate.
- Incubate the Test Plate for 60±1 minutes at 22°C±3°C.
- Wash the Test Plate four times with 300 µl 1x Wash Fluid working solution (see Appendix II).

DETECTION

Substrate reaction
- Add 100 µl of the Chromogen (TMB) substrate to each well of the Test Plate.
- Incubate the Test Plate for 15±1 minutes at 22°C±3°C.
- Add 100 µl of the Stop Solution to each well of the Test Plate.
  Remark: Start the addition of stop solution 15±1 minutes after the first well was filled with Chromogen (TMB) Substrate solution. Add the Stop Solution in the same order as the Chromogen (TMB) Substrate solution was dispensed.

  Note: The color of the Positive Controls will change from blue to yellow.

Detection
- Shake the Test Plate shortly (5-10 s.) either on an orbital shaker (~300 rpm) or manually on the working bench.
- Read the Test Plate in the ELISA reader at 450 nm within 15 minutes.
  Recommendation: Use a reference filter at 620 nm.

RESULT INTERPRETATION

Calculation of results

$$\frac{OD_{450\,nm}\ Sample}{OD_{450\,nm}\ Positive\ \ Control} * 100 = X\%\ positivity$$

Validation criteria
- The mean OD_{450} of the Positive Controls must be >1.0
- The mean percentage of positivity (PP) of the Weak Positive Controls must be > 35%
- The mean OD_{450} of the Negative Controls must be <0.2

If these criteria are not met, the results are invalid and the samples have to be retested.

Interpretation of results
Results obtained above or equal the cut-off of 20% PP are considered as positive.
Results obtained below the cut-off of 20% PP are negative.

Appendix I

Notice
This manual is believed to be complete and accurate at the time of publication. In no event shall Prionics AG be liable for incidental or consequential damage in connection with or arising from the use of this manual.

Liability
Prionics AG warrants its products will meet their applicable published specification when used in accordance with their applicable instructions and within the declared products life time. Prionics AG makes no other warranty, expressed or implied. There is no warranty of merchantability or fitness for a particular purpose. The warranty provided herein and the data, specifications and descriptions of Prionics AG products appearing in Prionics AG published catalogues and product literature may not be altered except by express written agreement signed by an officer of Prionics AG. Representation, oral or written, which are inconsistent with this warranty or such publications are not authorized and if given, should not be relied upon.
In the event of a breach of the foregoing warranty, Prionics AG's sole obligation shall be to repair or replace, at its option, the applicable product or part thereof, provided the customer notifies Prionics AG promptly of any such breach. If after exercising reasonable efforts, Prionics AG is unable to repair or replace the product or part, then Prionics AG shall refund to the customer all monies paid for such applicable product or part.

Prionics AG shall not be liable for consequential, incidental, special or any other indirect damages resulting from economic loss or property damage sustained by any customer from the use of its products.

Prionics AG is an ISO 9001:2000 certified company.

Appendix II

Preparation of Washing Fluid working solution and Conjugate Solution

Washing Fluid working solution
Mix indicated volumes of demineralized water and Washing Fluid (20x). Add 1% of Washing Fluid Additive to the solution and mix properly to obtain the desired volume of Washing Fluid working solution.
- Transfer 50 ml Washing fluid (20x) to a 2 l bottle.
- Add 940 ml of demineralized water and mix.
- Add 10 ml of Washing Fluid Additive, mix properly until a clear solution is obtained (approx. 30 minutes).

Volume Washing Fluid working solution		amount of Washing Fluid (20x)		amount of demin. water		amount of Washing Fluid Additive
0.3 l	=	15 ml	+	282 ml	+	3.0 ml
0.5 l	=	25 ml	+	470 ml	+	5 ml
1.0 l	=	50 ml	+	940 ml	+	10 ml
2.0 l	=	100 ml	+	1880 ml	+	20 ml

Remark: If the Washing Fluid (20x) shows precipitations, warm the bottle up in a warm water bath (approximately 30°C) until all salts are completely redissolved.

Conjugate working solution
Mix indicated volumes of Conjugate 30x with the appropriate amount of Conjugate Diluent (supplied with the kit) to obtain the desired amount of Conjugate.

No. of Plates	ml Conjugate needed		ml of Conjugate (30x)		ml of Conjugate Diluent
1	12 ml	=	0.4 ml	+	11.6 ml
2	24 ml	=	0.8 ml	+	23.2 ml
3	36 ml	=	1.2 ml	+	34.8 ml
4	48 ml	=	1.6 ml	+	46.4 ml
5	60 ml	=	2.0 ml	+	58.0 ml

Appendix III

Pipetting Schemes
Recommended pipetting scheme for **Dummy Plate and Test Plate**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Positive Control	Sample 3	Sample 11	Sample 19	Sample 27	Sample 35	Sample 43	Sample 51	Sample 59	Sample 67	Sample 75	Sample 83
B	Positive Control	Sample 4	Sample 12	Sample 20	Sample 28	Sample 36	Sample 44	Sample 52	Sample 60	Sample 68	Sample 76	Sample 84
C	Weak Positive Control	Sample 5	Sample 13	Sample 21	Sample 29	Sample 37	Sample 45	Sample 53	Sample 61	Sample 69	Sample 77	Sample 85
D	Weak Positive Control	Sample 6	Sample 14	Sample 22	Sample 30	Sample 38	Sample 46	Sample 54	Sample 62	Sample 70	Sample 78	Sample 86
E	Negative Control	Sample 7	Sample 15	Sample 23	Sample 31	Sample 39	Sample 47	Sample 55	Sample 63	Sample 71	Sample 79	Sample 87
F	Negative Control	Sample 8	Sample 16	Sample 24	Sample 32	Sample 40	Sample 48	Sample 56	Sample 64	Sample 72	Sample 80	Sample 88
G	Sample 1	Sample 9	Sample 17	Sample 25	Sample 33	Sample 41	Sample 49	Sample 57	Sample 65	Sample 73	Sample 81	Sample 89
H	Sample 2	Sample 10	Sample 18	Sample 26	Sample 34	Sample 42	Sample 50	Sample 58	Sample 66	Sample 74	Sample 82	Sample 90

Appendix IV

Safety Regulations and R&S Statements

National Safety Regulations must be strictly followed.

R&S Statements

Component 1
Test Plate
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 2
Sample Diluent (Ready-to-use)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 3 *Xn Harmful*
Washing Fluid (20 x conc.)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.
Hazard Code: Xn (Harmful); N (Dangerous for the environment)
S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice
S36/39: Wear suitable protective clothing and eye/face protection.
S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions safety data sheet.

Component 4
Washing Fluid Additive
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 5
Conjugate Diluent
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 6
Conjugate 30x
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 7
Chromogen (TMB) Substrate (Ready-to-use)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 8 *C Corrosive*
Stop Solution
Hazard Code: R35 Causes severe burns.
S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36/37/39 Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Component 10
Positive Control (Lyophilized)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 11
Weak Positive Control (Lyophilized)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 12
Negative Control (Lyophilized)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Contact

Prionics AG
Wagistrasse 27a
CH-8952 Schlieren-Zurich
Switzerland
Tel. +41 44 200 2000
Fax +41 44 200 2010
www.prionics.com
info@prionics.com

Cedi Diagnostics B.V.
P.O. Box 2271
8203 AG Lelystad
The Netherlands
Tel: +31 320 238320
Fax: +31 320 214379

For our distribution network, please refer to www.prionics.com

ANNEXE 4

Mode d'emploi : PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0

PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0

ELISA for *in vitro* detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in bovine serum and plasma samples

5 plate kit for 450 samples
©Prionics AG

Version 1.0_e

Package Insert

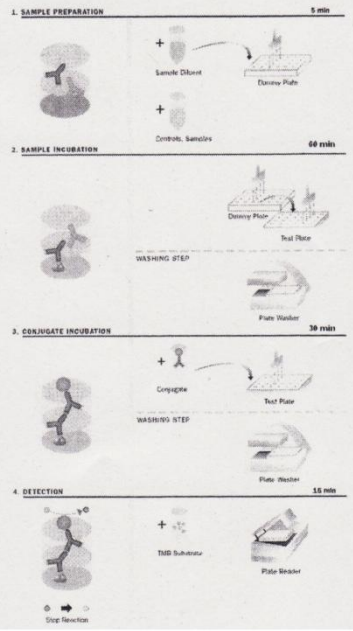
For *in vitro* veterinary diagnostic use only
Store at 5±3°C
Product No.: 7610530

Introduction

Bovine besnoitiosis is caused by infection with *Besnoitia besnoiti*, an apicomplexan protozoan parasite. The transmission of the disease and the life cycle of this parasite are to date not fully understood. There might be a mechanical transfer of the disease by biting flies, such as Tabanus and Stomoxys. All cattle breeds, independent of sex and age, can be infected. Affected cattle undergo different stages of disease with a range of symptoms including skin thickening, swelling, hair loss and skin necrosis. Infection in bulls can lead to infertility. In severe cases the disease leads to the animal's death. Cysts of *Besnoitia besnoiti* (200 - 600 µm in diameter) are found in the conjunctival sclera of the eyes, subcutaneous tissue, fascia and mucosa of the infected animals and remain in the animal for years.
Besnoitia besnoiti infections are likely to cause substantial economic losses and bovine health impairment. Therefore the identification of infected animals and of subclinical infected animals is crucial.

The PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 has been designed to detect antibodies specific for *Besnoitia besnoiti* in serum and plasma of bovines. The PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 is an excellent tool to screen cattle herds in order to identify infected animals. Identifying infected animals is important to avoid spreading of the disease and also to avoid introducing infected animals into a new herd.

Test Principle



The diagnostic assay for the detection of antibodies directed against *Besnoitia besnoiti* in bovine serum and plasma is based on ELISA technology. *Besnoitia* antigen is coated on the ELISA plate. Serum or plasma samples are incubated on the plate. A peroxidase (POD) labeled anti-pig antibody is used for the detection of antibodies bound to the antigen. Color development using TMB substrate measured optically at a wavelength of 450 nm shows the presence of antibodies directed against *Besnoitia besnoiti*. The PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 follows a four step protocol, consisting of Sample Preparation, Sample Incubation, Conjugate Incubation, and Detection. One plate with 90 prepared samples can be analyzed within 120 minutes.

Kit Components

Store kit at 5±3°C until expiry date. See kit label for actual expiry date. The shelf life of diluted, opened or reconstituted components is noted below, where appropriate. Chemical hazard data are available in section "Safety Regulations and R&S Statements" (Appendix IV).

Component 1
Test Plate (Strip Plate)
Five Test Plates are delivered in vacuum bags containing a desiccant bag.

Component 2
Sample Diluent (Ready-to-use)
Two bottles containing 60 ml of Sample Diluent.
Color of solution: yellow.

Component 3
Washing Fluid (20x)
(20x concentrated, dilute before use).
Two bottles containing 60 ml Washing Fluid. Preparation of Washing Fluid working solution see Appendix II.
Stability of Washing Fluid working solution: 2 weeks at 22±3°C.

Component 4
Washing Fluid Additive
One vial containing 5 ml Washing Fluid Additive.
Remark: viscous liquid.

Component 5
Conjugate Diluent (Ready-to-use)
One bottle containing 60 ml Conjugate Diluent.
Color of solution: red.

Component 6
Conjugate (30x)
(30x concentrated, dilute before use).
One vial containing 2 ml of Conjugate. Preparation of Conjugate working solution see Appendix II.
Dilute just before use.

Component 7
Chromogen (TMB) Substrate (Ready-to-use)
One bottle containing 60 ml of Chromogen (TMB) substrate.

Component 8
Stop Solution (Ready-to-use)
One bottle containing 60 ml Stop Solution.

Component 9
Demineralized Water
One vial containing 10 ml Demineralized Water.

Component 10
Positive Control (Lyophilized)
Two vials containing 150 µl lyophilized Positive Control.
Store at -20 to -80°C after reconstitution. Can be aliquoted or may be freeze-thawed up to five times.

Component 11
Weak Positive Control (Lyophilized)
Two vials containing 150 µl lyophilized Weak Positive Control.
Store at -20 to -80°C after reconstitution. Can be aliquoted or may be freeze-thawed up to five times.

Component 12
Negative Control (Lyophilized)
Two vials containing 150 µl lyophilized Negative Control.
Store at -20 to -80°C after reconstitution. Can be aliquoted or may be freeze-thawed up to five times.

Additional Kit Contents:
Package Insert

Additional Material Required

General:
Laboratory equipment according to national safety regulations

- Demineralized water or water of equal quality must be used
- Dummy plate, used for sample dilution (e.g. clear colorless round bottom 96 well plate) or equivalent
- Single channel pipette (10 – 100 µl)
- Single channel pipette (20 – 200 µl)
- Multichannel pipette (5 – 50 µl)
- Multichannel pipette (50 – 300 µl)
- Pipette tips (as recommended by pipette manufacturer)
- Solution reservoirs
- Vortex

Sample preparation:
- Appropriate blood collection tubes for serum or plasma collection.

Analysis of Results:
- Plate Reader, e.g. Multiscan EX or equivalent. The reader has to have an appropriate filter set to read the plates at 450 nm.

Optional:
- Plate washer, e.g. Tecan HydroFlex™, 96 Plate Washer™ or equivalent.

Test Procedure

Precautions
National guidelines for working with animal samples must be strictly followed. The PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 must be performed in laboratories suited for this purpose.
Samples should be considered as potentially infectious and all items which contact the samples as potentially contaminated.
Chemical hazard data are available in section "Safety Regulations and R&S Statements" (Appendix IV).

PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0

Equipement optionnel:
- Laveur de plaques: Tecan HydroFlex™, 96 Plate Washer™ ou équivalent.

Mode opératoire

Précautions
Les recommandations nationales pour la manipulation d'échantillons animaux doivent être suivies de façon stricte. Le test PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0 ne doit être réalisé que dans les laboratoires équipés à cet effet.
Les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Tout matériel en contact avec ces échantillons doit être considéré comme potentiellement contaminé.
Les informations sur les risques chimiques sont données dans le paragraphe « Normes de Sécurité – Risque et Sécurité » (Annexe IV).

Remarques
Pour obtenir des résultats optimums avec le test PrioCHECK® Besnoitia Ab 2.0, les précautions suivantes doivent être prises:

Le mode opératoire doit être rigoureusement suivi.
- Tous les réactifs du coffret doivent être ramenés à T° ambiante (22±3°C) avant utilisation.
- L'embout des pipettes doit être changé chaque fois qu'un nouvel échantillon ou réactif est prélevé.
- Des réservoirs séparés doivent être utilisés pour chaque réactif.
- Les composants du coffret ne doivent pas être utilisés après la date de péremption ou si un changement dans leur aspect est observé.
- Les composants provenant de coffrets portant des numéros de lots différents, ne doivent pas être associés dans une même série de tests.
- Le test doit être réalisé avec de l'eau déminéralisée ou une eau équivalente.

PREPARATION DES SOLUTIONS

Contrôles
Les sérums de contrôle sont reconstitués en ajoutant 150 µl d'Eau déminéralisée (Composant 9). Mélanger par vortex et retourner plusieurs fois les flacons.
Les sérums de contrôle doivent être reconstitués 30 minutes avant l'usage and laissés à température ambiante.

Solution de lavage
Préparer la solution de travail de lavage en mélangeant 1 dose de Solution de lavage (20x) (Composant 3) avec 19 doses d'eau déminéralisée ou une eau de même qualité ainsi que 0,02 dose d'Additif pour solution de lavage (soit 0.1%) (Composant 4). Mélanger jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Voir la table de dilution (Annexe II).
Remarque: si la solution de lavage (20x) fait apparaître un précipité, réchauffer le flacon à 30°C dans un bain d'eau chaude jusqu'à ce que le précipité se dissolve entièrement.

Conjugué
Préparer le Conjugué (30x) (Composant 6) en mélangeant 1 dose de conjugué avec 29 doses de Diluant conjugué (Composant 5).
Remarque: La solution de travail du conjugué doit être préparé juste avant utilisation.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

1.1 Utiliser une plaque non sensibilisée ou un équivalent pour la première phase de dilution de l'échantillon comme indiqué au point "équipment nécessaire".
1.2 Ajouter 10 µl de Sérum de contrôle positif (Composant 10) dans les puits A1 et B1 de la plaque non sensibilisée.
1.3 Ajouter 10 µl de Sérum de contrôle positif faible (Composant 11) dans les puits C1 et D1 de la plaque non sensibilisée.
1.4 Ajouter 10 µl de Sérum de contrôle négatif (Composant 12) dans les puits E1 et F1 de la plaque non sensibilisée.
1.5 Ajouter 10 µl d'échantillon de sérum ou plasma dans les autres puits de la plaque non sensibilisée.
1.6 Ajouter 90 µl de Tampon de dilution échantillon (Composant 2) dans chacun des puits de la plaque non sensibilisée et mélanger en pipetant 5 fois.
1.7 Ajouter 90 µl de Tampon de dilution échantillon (Composant 2) dans chacun des puits de la Microplaque (Composant 1).
1.8 Transférer 10 µl des échantillons dilués et sérums de contrôle de la Microplaque (Composant 1) non sensibilisée vers la microplaque et mélanger en pipetant 5 fois.

INCUBATION DES ECHANTILLONS

2.1 Incuber les échantillons sur une microplaque pendant 60±1 minutes à T° ambiante (22±3°C).
2.2 Laver la microplaque quatre fois avec 300 µl de la solution de travail de lavage (voir Annexe II).

Remarque: si vous utilisez un laveur de plaque, assurez-vous qu'aucune aiguille n'est obstruée.

INCUBATION AVEC LE CONJUGUE

3.1 Ajouter 100 µl de conjugué dilué dans chacun des puits de la microplaque.
3.2 Incuber la microplaque pendant 30±1 minutes entre 22±3°C.
3.3 Laver la microplaque quatre fois avec 300 µl de solution de travail de lavage (voir Annexe II).
3.4 Enlever le liquide résiduel en tapotant fermement les plaques sur du papier absorbant après le dernier cycle de lavage.

Remarque: La solution de lavage peut perturber le substrat lors de l'étape de détection.

DETECTION

Incubation avec le Substrat chromogène (TMB)
4.1 Ajouter 100 µl de Substrat chromogène (TMB) (Composant 7) dans chacun des puits de la microplaque.
4.2 Incuber la microplaque pendant 15±1 minutes entre 22±3°C.
4.3 Ajouter 100 µl de Solution d'arrêt (Composant 8) dans chacun des puits de la microplaque.

Remarque: commencer à ajouter la solution d'arrêt 15±1 minutes après avoir rempli le premier puits avec le Substrat chromogène (TMB). Ajouter la solution d'arrêt en gardant le même ordre de distribution que pour le Substrat chromogène (TMB).

LECTURE DU TEST ET CALCUL DES RESULTATS

5.1 Agiter la microplaque rapidement (5-10 s.) soit en utilisant un agitateur orbital (~300 rpm) ou manuellement sur le plan de travail.
5.2 Lire la microplaque dans un lecteur ELISA à 450 nm dans les 15 minutes qui suivent l'ajout de la solution stop.
5.3 Calculer la moyenne des valeurs de DO_{450} des contrôles (Puits A1 et B1 = moyenne des contrôles positifs, Puits C1 et D1 = moyenne des contrôles positifs faibles , Puits E1 et F1 = moyenne des contrôles négatifs).

Recommandation: Utiliser un filtre de référence à 620 nm.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Calcul des résultats

$$\frac{OD_{450}\ de\ l'échantillon}{OD_{450}\ du\ sérum\ de\ l'contrôle\ positif} \xrightarrow{\times\ 100} X\%\ de\ positivité$$

Validation des critères
6.1 La DO_{450} moyenne des sérums de contrôle positifs doit être >1.2
6.2 Le pourcentage moyen de réactions positives (PP) des sérums de contrôle positifs faibles doit être > 35
6.3 La DO_{450} moyenne des sérums de contrôle négatifs doit être <0.15
Si ces critères ne sont pas validés, les résultats de la série de tests sont ininterprétables et les échantillons devront être testés à nouveau.

Interprétation des résultats
PP ≥ 15 (positif)
Si les résultats obtenus sont supérieurs ou égaux au seuil de 15, le PP est considéré comme positif.

PP < 15 (négatif)
Si les résultats obtenus sont inférieurs au seuil de 15, le PP est considéré comme négatif.

Annexe I

Avertissement
Les informations contenues dans cette notice sont considérées comme étant complètes et exactes au moment de leur publication. Prionics AG ne peut en aucun cas être tenu pour responsable des dommages fortuits ou indirects liés à l'utilisation de ce document ou en résultant.

Responsabilité
Prionics AG garantit que ses produits sont conformes aux caractéristiques décrites sous réserve qu'ils soient utilisés selon les instructions fournies et dans les délais de conservation indiqués. Prionics AG exclut toute autre garantie, explicite ou implicite, y compris la garantie d'aptitude à la vente ou de conformité pour une utilisation particulière. La garantie mentionnée ici, ainsi que les informations, spécifications et descriptions des produits commercialisés par Prionics AG figurant dans les catalogues Prionics AG ou dans tout autre document, ne peuvent pas être modifiées, sauf consentement écrit express de Prionics AG. Les présentations orales ou écrites, ou les publications non conformes à cette garantie ne sont pas autorisées et sont sujettes à caution.
En cas de rupture de la garantie, l'obligation de Prionics AG se limite à la réparation ou à l'échange, à sa discrétion, du produit ou d'une partie du produit, sous réserve que le client informe rapidement Prionics AG de cette rupture de garantie. Au cas où la société Prionics AG ne pourrait pas réparer ou remplacer le produit ou une partie du produit, elle devra rembourser au client l'intégralité des sommes perçues pour ce produit ou pour partie de ce produit.

Prionics AG ne peut être tenu pour responsable des dommages fortuits, particuliers ou indirects y compris ceux résultant d'une perte économique ou d'un dommage matériel subis par un client suite à l'utilisation de ses produits.

Prionics AG est une entreprise certifiée ISO 9001:2000.

Annexe II

Préparation de la solution de travail de lavage et du conjugué

Solution de travail de lavage
Mélanger les volumes indiqués d'Eau déminéralisée et de Solution de lavage (20x) (Composant 3). Ajouter 0.1% d'Additif pour solution de lavage (Composant 4) à la solution et mélanger correctement pour obtenir le volume désiré de solution de travail de lavage.
- Transférer 50 ml de Solution de lavage (20x) (Composant 3) dans un flacon de 2 l.
- Ajouter 950 ml d'eau déminéralisée et mélanger.
- Ajouter 1 ml d'Additif pour solution de lavage (Composant 4), mélanger correctement jusqu'à l'obtention d'une solution claire (environ 30 minutes).

Appendix IV

Safety Regulations and R&S Statements

National Safety Regulations must be strictly followed.

R&S Statements

Component 1
Test Plate
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 2
Sample Diluent (Ready-to-use)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 3 *Xi Irritant*
Washing Fluid (20x)
R43: May cause sensitization by skin contact.
S24: Avoid contact with skin.
S37: Wear suitable gloves.

Component 4
Washing Fluid Additive
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 5
Conjugate Diluent (Ready-to-use)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 6
Conjugate (30x)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 7
Chromogen (TMB) Substrate (Ready-to-use)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 8 *C Corrosive*
Stop Solution (Ready-to-use)
Hazard Code: R35 Causes severe burns.
S26: In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
S45: In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Component 9
Demineralized Water
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 10
Positive Control (Lyophilized)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 11
Weak Positive Control (Lyophilized)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Component 12
Negative Control (Lyophilized)
Hazard Code: This product is not classified according to EU regulations.

Contact

Prionics AG
Wagistrasse 27a
CH-8952 Schlieren-Zurich
Switzerland
Tel. +41 44 200 20 00
Fax +41 44 200 20 10
www.prionics.com
info@prionics.com

Prionics Lelystad B.V.
P.O. Box 2271
8203 AG Lelystad
The Netherlands
Tel: +31 320 714 000
Fax: +31 320 714 029

For our distribution network, please refer to www.prionics.com

Toulouse, 2013

NOM : LENFANT PRÉNOM : FRANÇOIS

TITRE : Mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte de la Besnoitiose bovine à *Besnoitia besnoiti*.

RÉSUMÉ : La Besnoitiose bovine est une maladie des bovins reconnue émergente en Europe (EFSA, 2010) et qui engendre de lourdes pertes économiques. La plupart des animaux atteints sont asymptomatiques et forment un réservoir qu'il est indispensable d'identifier au plus vite. Ce travail présente la mise au point d'une technique de diagnostic sérologique par immunofluorescence indirecte (IFI) au laboratoire de parasitologie de l'ENV de Toulouse. Cette étude a permis d'évaluer les performances de l'IFI par comparaison au Western Blot (Gold Standard) et à l'ELISA, grâce à l'analyse de 403 sérums et en utilisant quatre dilutions (1:100, 1:200, 1:400, 1:800). En considérant un seuil de positivité à la dilution 1:200, l'IFI a montré un accord quasi-parfait avec le Western Blot (κ = 0,940), avec une sensibilité de 91,8% et une spécificité de 100%. Il s'agit d'une technique assez lourde à mettre en œuvre, mais permettant de confirmer le statut sérologique des échantillons lors de discordances entre les résultats obtenus par ELISA et Western Blot.

MOTS-CLÉS : BESNOITIOSE – *BESNOITIA BESNOITI* – DIAGNOSTIC – SEROLOGIE – IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE – WESTERN BLOT – ELISA.

ENGLISH TITLE: Development of an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) for the diagnosis of bovine besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*).

ABSTRACT: Bovine besnoitiosis is an emergent disease in Europe (EFSA, 2010) and is responsible for heavy economic losses. Most affected animals are asymptomatic and constitute a group that is essential to identify as quickly as possible. This work presents the development of an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) at the Laboratory of Parasitology in ENV Toulouse. In this study we evaluated the performance of the IFAT compared to Western Blot (Gold Standard) and to ELISA, through the analysis of 403 serum and using four dilutions (1:100, 1:200, 1:400, 1: 800). Considering the positive cut-off at 1:200 serum dilution, the IFAT showed an almost perfect test agreement with the Western Blot; (κ = 0.940) showing a relative sensitivity of 91.8% and a relative specificity of 100%. It is quite a difficult technique to set up. However, it remains very useful to confirm the serological status of samples when discrepancy of results occurs between ELISA and WB.

.

KEYWORDS: BESNOITIOSIS – *BESNOITIA BESNOITI* – DIAGNOSIS – SEROLOGY – INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ANTIBODY TEST – WESTERN BLOT – ELISA.